

Témavezető: Dr. Hermann Róbert

A jelen OTKA pályázat kutatási munkatervében kitűzött célok megvalósultak, egyes célkitűzéseket sikerült a vártnál tovább is fejleszteni. A program az elmúlt három év alatt országos diabetes genetikai projektté nőtte ki magát, mely 2006 ősze óta önálló laboratóriumban, önálló munkacsoporttal működik a témavezető irányításával (www.diabet.hu/diabetesgenetics).

Tartalom

<i>Témavezető: Dr. Hermann Róbert</i>	1
1. A HUN-T1D-GENES program.....	2
A DNS és adatbank státusza	3
2. A genetikai vizsgálatok eredményei	3
2.a A Class II HLA faktorok és az 1-es típusú diabetes összefüggése	3
A diabetesre hajlamosító HLA haplotípusok ismertetése	3
A védő HLA haplotípusok ismertetése	4
A HLA genotípus és a T1D összefüggése	5
2.b A HLA non-Class II génrégiók vizsgálata.....	5
A HLA B39 és a T1D összefüggése	5
A HLA Class III génrégió és T1D	5
3. A T1D non-HLA genetikai faktorainak vizsgálata.....	6
3.a A PTPN22 és T1D összefüggése	6
3.b PAX4 és T1D.....	7
3.c Az INS és a CTLA4 génrégiók	7
4. A genetikai szűrési modell.....	7
4.a Klinikai követési protokoll.....	8
5. A neonatalis diabetes formák genetikai háttere	8
6. Publikációs aktivitás összefoglalása	8
7. Az eredmények összegzése.....	9
8. Ábrák és táblázatok.....	11
Appendix 1.....	19
HLA B39 affects the type 1 diabetes predisposing effect of DRB1*0404- DQB1*0302 haplotypes.....	19
Appendix 2.....	20
Reduced CD4+ T-cell activation in children with type 1 diabetes carrying the PTPN22/Lyp 620Trp variant	20
Appendix 3.....	21
HUN-T1D-GENES program Követési Protokoll	21
Appendix 4.....	27
A high throughput population screening system for the estimation of genetic risk for type 1 diabetes	27

1. A HUN-T1D-GENES program

A magyar gyermekdiabetes centrumok kollaborációja az 1-es típusú diabetes genetikai faktorainak átfogó vizsgálatára.

A diabetes genetikai vizsgálatokhoz szükséges mintagyűjtési program keretében 2004-2006-ban az egész ország területéről 28 gyermek-diabetes centrumból 4650 DNS minta került begyűjtésre, amely 1850 T1D gyermek (ebből 1400 teljes család; páciens, szülei és testvéreik{n=460}) mintáiból áll össze. A résztvevő centrumok között szerepel 18 megyei kórház gyermekdiabetes gondozója, valamint a hazai négy orvosi egyetem gyermekklinikái, s néhány kisebb városi központ. Tekintettel arra, hogy a program iránt a várakozásnál lényegesen nagyobb volt az érdeklődés az orvoskollégák között, minden centrum, amely jelentkezett, bekerült a programba. A centrumok listája a beszámoló végéhez csatoltan látható (1. táblázat).

- Kollaboráció alakult ki a Magyar Gyermekdiabetes Regiszterrel (Prof. Soltész Gyula, PTE Gyermekklinika, Pécs) amellyel együttműködve egy átfogó genotípus-phenotípus analízis és incidencia vizsgálat készült a teljes anyagon (lásd publikációk).

- A genetikai kutatómunka szoros együttműködésben zajlik a finn Immunogenetics Laboratory-val (Professzor Jorma Ilonen, University of Turku, Turku, Finland). Az antitest meghatározásokra és a betegség incidenciájának komparatív vizsgálatára együttműködés jött létre a a Finnish Childhood Diabetes Registry-vel, melynek vezetője Prof. Mikael Knip (Hospital for Children and Adolescents, University of Helsinki, Helsinki, Finland).

- 2005-ben készült el a program weblapja, ahol mind szakemberek, mind a szülők részére részletes leírás található a kutatás jelentőségéről és a csatlakozás módjáról. A weblap címe: www.diabet.hu/diabetesgenetics.

A programot a Magyar Diabetes Társaság hivatalosan is támogatja, a weblap fenntartását és frissítését ők segítik. A program a HUN-T1D-GENES nevet vette fel.

A program kollaboratív kapcsolatai és működési sémája az 1. ábrán látható.

- Fontos előrelépés, hogy 2005 január 1-től elindult a DNS és szérum minták prospektív gyűjtése, mely egy részletes klinikai adatgyűjtéssel is összekapcsolódik. Ennek keretében minden, az egész ország területén újonnan diagnosztizált diabeteses gyermektől, annak testvéreitől és szüleitől minta-gyűjtés történik, a Gyermekdiabetes Regiszterrel együttműködve. A résztvevők a diabetes rizikójáról szóló információt megkapják (genetikai és immunológiai adatok alapján becsült adat) a kezelőorvosuktól, és a magas rizikójú gyermekek követés alá kerülnek, illetve egyéb vizsgálatokban vehetnek részt. Ide megfigyeléses követési vizsgálat és prevenciók tartozik, melyek szervezése folyamatban van, s jelen pályázattól függetlenül finanszírozott.

- Az OTKA program teljesítésének és továbbfejlesztésének feltételei tovább bővültek, mivel más forrásból sikerült felvenni teljes munkaidőben egy PhD hallgatót és egy vegyészt akik 2006-tól kapcsolódtak be a projektbe. Az elmúlt évben megalakult az Immunogenomika Laboratórium a Semmelweis Egyetemen, a témavezető irányítása alatt, ahol a program az OTKA pályázat lezárta után is folytatódik.

A DNS és adatbank státusza

- A fent említett (n=4650) DNS mintákkal együtt begyűjtött adatok, s a genetikai vizsgálatok során nyert adatok egy MS Access adatbázisba kerültek. A begyűjtött mintákon megtörtént a DNS izolálás, a munka plate-kre történő aliquotok kihígítása. A minták anonym módon kódoltak, s a központi adatbázisban kapcsolnak a hozzájuk tartozó epidemiológiai adatokkal. A DNS és adatbank az Immungenomika Laboratóriumban (Semmelweis Egyetem, Budapest, 1. sz. Gyermekklinika területén) van tárolva és kezelve.

2. A genetikai vizsgálatok eredményei

Az 1-es típusú diabetesz HLA és egyes non-HLA gének által determinált genetikai major és minor faktorainak részletes vizsgálata és a populáció-specifikus betegség markerek azonosítása.

2.a A Class II HLA faktorok és az 1-es típusú diabetes összefüggése

A HLA DRB1-DQA1-DQB1 gének vizsgálata megtörtént 1350 T1D család esetében, mely becsléseink szerint a hazai 14 év alatti esetek több mint 50%-a.

A 2. táblázatban adunk áttekintést a diabéteszre hajlamosító illetve védő haplotípusokról. Azon haplotípusok esetében, ahol a különbség szignifikáns, feltüntettük a relatív rizikó értékeket. A teljes anyag elemzéséig a részletes statisztikai adatok publikációjától itt eltekintünk. Az adatok T1D család triókból származnak, ahol két egészséges szülő és egy diabeteses gyermek van. A kontroll haplotípusok ún. család-alapú mesterséges kontrollrok.

A diabetesre hajlamosító HLA haplotípusok ismertetése

A magyar populációban észlelhető, diabéteszre hajlamosító HLA haplotípusok megoszlása a kaukázusi rasszra jellemző. A magyar népesség genetikai szempontból heterogén, ami a környező népcsoportokkal történt nagyarányú keveredéssel magyarázható. Ez tükröződött a főbb diabetogén haplotípusok megoszlásában, melyben a közép-európai HLA variánsokkal együtt mediterrán és észak-európai elemek kombinációja látható. A magyar populációban a DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201¹ volt a leggyakoribb diabetogén haplotípus, ami a mediterrán országokban a legnagyobb rizikót jelenti. Kimutattuk, hogy a DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 haplotípus kombinációja más semleges haplotípusokkal fokozott diabétesz rizikót jelent fiúkban, míg lányokban nem. Ez a nem-specifikus különbség észlelhető más populációkban is és arra utal, hogy az X kromoszómán korábban leírt diabétesz lókuszt a DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 haplotípussal interakcióban elsősorban a férfiakban növeli a betegség-hajlamot.

¹ A HLA molekulák nevezéktanában az első betű jelöli az osztályt (pl. D esetén HLA II. osztályról van szó), a második betű a géncsalád nevét (M, O, P, Q vagy R), a harmadik betű pedig azt, hogy melyik polipeptidláncról (A vagy B) van szó. Az adott gént az ezt követő arab szám jelöli, így alakul ki a gén név, például DQB1. Ezt egy csillaggal elválasztva a megfelelő allélvariánsra utaló szám követi. A HLA DRB1*0401 jelentése: HLA II. osztály, DQB1 gén (DQ molekula β-lánc, 1-es gén) 0401-es variáns.

A HLA génrégióban az egymás mellett elhelyezkedő gének variánsai (alléljai) fizikailag erősen kapcsolnak, és együtt öröklődnek. Ezeket az egységeket haplotípusoknak nevezzük.

A többi hajlamosító haplotípust megfigyelve láthatjuk, hogy hazánkban a skandináv országokra jellemző DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302 haplotípus csoport magasabb rizikót jelent mint a fent említett DR3 haplotípus. Fontos, hogy markáns geográfiai különbségek jellemzők a DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302 haplotípuson észlelhető DRB1 allélek hajlamosító hatásában. Észak-Európában a DRB1*0401 hatása a legerősebb, melyet a *0404 allél követ, azonban az olasz vagy görög populációban a *0405 és a *0402 allélek diabetogén hatása fokozottabb (Hermann et al. Tissue Antigens, 2003).

A magyarokban a legerősebb hajlamosító effektus a DRB1*0402 és *0401 altípusok esetében volt kimutatható. Érdekes módon a DRB1*0405-DQA1*0301-DQB1*0302 klasszikusan mediterrán magas diabétesz kockázatot hordozó és a DRB1*0403 protektív haplotípus ritkának bizonyult a magyar populációban. A jelenség valószínűleg olyan szelekciós faktorokkal hozható összefüggésbe, mint az eltérő éghajlati vagy táplálkozási tényezők, infekciók.

A magyar populációban is megtalálható a DRB1*0408-DQA1*0301-DQB1*0304, egy ritka, de erősen diabetogén haplotípus, mely a finnekben és az észtekben észlelhető még, és közös genetikai eredetre utalhat.

A korábbi kisebb populáción végzett magyar adatokat kiegészítve e programban találtunk egy jellemzően mediterrán diabéteszre hajlamosító haplotípust is, a DRB1*0405-DQA1*03-DQB1*0201 kombinációt. Ez nagyon jellemző variáns a magas incidenciájú Szardíniai populációban.

A védő HLA haplotípusok ismertetése

A fő protektív haplotípusok egy nagyon érdekes csoportot alkotnak (2. táblázat). A jól ismert, erősen védő DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 megfelel a régebbi nevezéktannal DR2 vagy DR2-DQ6-nak nevezett haplotípusnak. Fontos kiemelni, hogy a DRB1*0403 és a DQB1*0302 allélok által definiált haplotípus erősen védő hatású, ellentétben a DQB1*0302 más DRB1*04 allélekkel alkotott kombinációival (pl. DRB1*0401, lásd feljebb a táblázatban). Nem tudjuk a jelenség okát, lehet hogy ez specifikus a DRB1*0403 allélre, vagy egy kapcsolt génre, a HLA 2. osztályú génrégióban. Gyakori védő haplotípus csoport a magyar populációban a DRB1*11/12/13-DQA1*05-DQB1*0301, valamint a DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201, DRB1*1301-DQA1*0103-DQB1*0603 és a DRB1*1401-DQA1*0104-DQB1*0503 kombinációk. Ezek, a DQ6 haplotípushoz hasonlóan nagyrészt domináns öröklésmenettel hordozzák a protektív hatást.

Az észak-európai népektől eltérően a magyar populációban a DRB1*1401-DQB1*0503 erősen védő haplotípus relatíve gyakori volt, hasonlóan néhány mediterrán néphez, ahol szintén alacsonyabb a diabétesz incidenciája. Ez felveti azt a lehetőséget hogy a haplotípus jelenléte Közép és Dél-Európában hozzájárul az alacsonyabb diabétesz incidenciához.

Fontos megemlíteni azt, hogy a DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303 haplotípus védő, míg ugyanez a DQB1 allél a DR9 haplotípussal neutrális hatású (lásd feljebb a 2. táblázatban). Ez a jelenség újabb példával illusztrálja a DR és DQ lokusz bonyolult interakcióját. A HUN-T1D-GENES programban felismert új védő haplotípus a DR15-DQB1*0601 kombináció, mely további vizsgálataink tárgya.

A HLA genotípus és a T1D összefüggése

Az 1-es típusú diabétesz iránti hajlam öröklésmenete nem követi a Mendeli szabályokat, azonban általános szabályként elfogadott, hogy a cukorbetegségre hajlamosító HLA haplotípusok (DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302, DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201) hatása recesszív módon nyilvánul meg, míg az erős protektív haplotípusok (DRB1*1501-DQB1*0602, DRB1*1301-DQB1*0603) domináns módon viselkednek.

Jól látható ez az effektus a 3. táblázatban, ahol feltűnik hogy a hajlamosító és védő haplotípusok kombinációi semlegesek vagy védők, míg a hajlamosító haplotípusok kombinációi hajlamosító hatásúak. Jó példa erre a DR15-DQB1*0602 haplotípus hatása, mely minden genotípusban domináns protektív volt és a diabéteszes betegeknek 0.3%-ban volt csak kimutatható. Érdekes jelenség, hogy a DQB1*0603 a DQB1*0302 allélel együtt hajlamosító hatású, azonban ha külön vizsgáljuk a 2000. év előtt diagnosztizált eseteket a 2000 után diagnosztizált esetekkel, akkor ezt a hatást az első csoportban nem találjuk meg. Ez kritikusan fontos megfigyelés, hiszen azt igazolja, hogy az utóbbi néhány évben alacsonyabb genetikai rizikó is elég volt a T1D kialakulásához mint 10-20 évvel ezelőtt. Ez a megfigyelés egybevág a korábban végzett saját vizsgálatokkal a finn populációban, és a hazai T1D incidencia drasztikus emelkedését jósolja. E témában született kézirat a Diabetologia folyóiratnál áll elbírálás alatt (Lukács et al. Diabetologia, 2007 submitted).

Láthatjuk a 3. táblázatban, hogy a diabéteszes betegek legnagyobb része a hajlamosító DR4-DQB1*0302, a DR3-DQA1*05-DQB1*0201 egymással valamint neutrális haplotípusokkal alkotott kombinációit hordozza. Kiemelkedően gyakori a DR3-DQA1*05-DQB1*0201/DR4-DQB1*0302 heterozigóta kombináció, mely esetében a magas rizikóért valószínűleg a nagy számú diabetogén DQ molekula felelős. Ebben az esetben a DQA1 és DQB1 allélek 4 lehetséges diabetogén molekulát kódolnak, míg más genotípusok esetén a diabetogén DQ molekulák aránya kisebb.

A HLA genotípusok és a T1D összefüggését mutató táblázat (3. táblázat) segítséget kíván nyújtani a e bonyolult genetikai hatások értelmezéséhez. Szem előtt kell minden esetben tartuk, hogy az adott egyén rizikójának megbecslésekor mindig a teljes HLA DRB1-DQA1-DQB1 genotípust szükséges értékelni a fogékonysági és védő haplotípusok interakciójának együttes figyelembe vételével.

2.b A HLA non-Class II génrégiók vizsgálata

A HLA B39 és a T1D összefüggése

Azonosítottuk, hogy a HLA B39 allél, amely a DRB1*0404-DQB1*0302 haplotípuson található, fokozza a diabetes rizikóját (Hazard ratio 4.5, 95%CI 2.3-9.4, $p < 10^{-6}$; 4. ábra). Emellett sikerült kimutatni, hogy az autoimmunitás progresszióját is szabályozza. Az eredményekből írt kézirat jelenleg áll beküldés alatt (absztrakt az 1. sz. Appendixben olvasható (Gombos et al, 2007, submitted).

A HLA Class III génrégió és T1D

Kimutattuk, hogy a complement gének közül a C4B gén egyik variánsa befolyásolja a diabetes rizikóját. A hordozókban nagyobb valószínűséggel alakul ki e betegség (RR 4.2, 95%CI 2.7-7.5; $p < 10^{-3}$). A transzmisszió disequilibrium teszt eredményét 840 magyar T1D családban az alábbi táblázat mutatja. Csak a HLA B62-DRB1*0401 haplotípus eredményeket tüntettem fel.

	T	NT	%T	p
DR401-C4B/A	89	10	89.9	1.723e-017
DR401-C4B/C	159	39	80.3	1.93e-018
p-value for the difference in %T = 0.002				

Fontos megemlíteni hogy ez az allél csak a DRB1*0401 haplotípuson van jelen.

A C4B gén összefüggését T1D-vel megvizsgáltuk egy finn követési kohortban is, az eredményeket a 5. ábrán mutatjuk be. A teljes anyag publikációja folyamatban van, a kéziratot a Diabetes folyóiratnak küldtük be (Lipponen et al. 2007, submitted). A további eredmények ismertetésétől itt eltekintek a téma nagyon kompetitív jellege miatt.

3. A T1D non-HLA genetikai faktorainak vizsgálata

3.a A PTPN22 és T1D összefüggése

A PTPN22 gén (OMIM*600716) az 1 kromoszóma p13 régiójában található. A gén fehérje terméke egy lymphoid tyrosine phosphatase (LYP). A LYP a lymphocytákban expresszálódik, bizonyos protein kinázokat (pl. a Csk-t) defoszforilál, ezáltal azok működése gátlódik, ami az intracelluláris Ca-influx és a citokin release csökkenését eredményezi. A PTPN22 génben a 620. aminosav pozícióban kimutatható egy Arg/Trp polimorfizmus. A Trp variáns egy fokozott funkciójú mutáció, mely autoimmun betegségekre, így 1-es típusú diabéteszre is hajlamosít (Bottini et al. Nature Genetics, 2004). Ez a Trp variáns a hibás defoszforiláció révén pathológiásan csökkent T-sejt választ eredményez, ami a β -sejt specifikus autoimmunitás kialakulásának alapját képezheti. Kimutattott, hogy kevesebb IL-2 termelődik a mutációt hordozókban, így mérséklődik az immunválasz erőssége.

Az észlelés fontossága miatt PTPN22 gén és a T1D társulását 1019 páciens és 713 kontroll mintáin megvizsgáltuk a magyar anyagban. Azt észleltük, hogy az Arg/Arg homozygóta genotípus szignifikánsan növeli a diabetes rizikóját (OR 2.7 95% CI 1.3-4.6, $p=3 \times 10^{-6}$). Ehhez kapcsolódóan a finn munkacsoporttal való együttműködés keretében kimutattuk, hogy a Trp variáns fokozott rizikót jelent az insulin autointest megjelenésére és az autoimmunitás progressziójára (Hermann et. al. Diabetologia, 2006, 49:1198-1208). Ez a hatás kifejezettebb volt magas HLA rizikójú DR3-DQ2/DR4-DQ8 genotípusú egyéneknél és fiúknál még alacsony rizikójú HLA genotípus esetén is. Ugyanakkor a PTPN22 Trp variáns nem befolyásolta a GADA és az IA-2A autoantitestek megjelenését. A PTPN22 Trp genotípus hajlamosító hatása erősebb volt az INS gén I. osztályú VNTR variánsa esetén, míg a CTLA4 génnel való kölcsönhatására nem volt bizonyíték.

Érdekes, hogy a PTPN22 Trp/Trp kombináció fiúknál jobban fokozta a T1D rizikót mint lányoknál és ezen variáns hordozása esetén fiatalabb életkorban manifesztálódott a cukorbetegség.

Feltételezhető, hogy a PTPN22 jelenti a közös predisponáló faktort más autoimmun betegségekre is (pl. rheumatoid arthritis, systemás lupus erythematosus, Graves-Basedow kór, Hashimoto thyreoiditis, autoimmun eredetű Addison-kór).

Ennek feltárására egy 400 fős beteganyagon jelenleg vizsgáljuk a T1D valamint más autoimmun betegségek halmozódásának összefüggését a PTPN22 gén 620Trp variánsával. E munka egyik fázisához kapcsolódóan kimutattuk, hogy ez a génvariáns

csökkent T-sejt receptor aktiválódást okoz, ami tükröződik az intracelluláris calcium flux-ban változásaiban, a T-sejt proliferációban és az interleukin-2 szerkégióban is. Ezek az eredmények most állnak elbírálás alatt (Aarnisalo et al. J. Autoimmunity, 2007 submitted.). A közlemény absztraktja a 2. appendixben csatolva van.

3.b PAX4 és T1D

Elemeztük a PAX4 transcriptio faktor gén és a T1D összefüggését is, mivel egy svájci-német tanulmány (Biaison-Lauber et al. Diabetologia, 2005, 48:900-905) felvetette e genetikai társulás lehetőségét.

Vizsgálataink kizárták a PAX4 szerepét a T1D öröklött hátterének kialakításában, mely eredményeket publikáltuk (Hermann et al. Diabetes, 2005 54:2816-2819).

Eredményeinket 4 másik munkacsoport is megerősítette (Geng et al, Paterson AD, Maier et al., Gylvin et al, Diabetologia, 2005, 48:900-905).

3.c Az INS és a CTLA4 génrégiók

Az inzulin (INS) gén esetében kimutatható volt, hogy a –2221 MspI CC genotípus 1-es típusú diabetesre hajlamosít (OR 2.74, 95% konfidencia intervallum 1.72-4.39, $p<0.00001$), míg a CT és TT genotípusok negatív betegség asszociációt mutatnak (OR 0.37, 95% konfidencia intervallum 0.23-0.58, $p=0.00008$). A CTLA4 +49 A/G polimorfizmus esetében azt láttuk hogy e polimorfizmus hatása lényegesen gyengébb, a GG genotípus hajlamosító míg az AA genotípus védő hatású (AA genotípus OR 0.63, 95% konfidencia intervallum 0.43-0.92, $p=0.015$, $df=2$). A HLA, az INS és a CTLA4 gén hatása egymástól nagyrészt független.

Az INS és a CTLA4 gének tipizálását jelenleg 1400 magyar családra egészítjük ki, az eredmények publikálása 2007 folyamán várható. A CTLA4 esetében egy komparatív vizsgálat készül, ahol az ICOS és a CTLA4 gén 3'UTR régióját térképezzük, ugyanis a CT60 variáns (Ueda et al. Nature, 2004) mellett valószínűleg populációspecifikus variánsok is hozzájárulnak a T1D-specifikus autoimmunitás kialakításához.

Megvizsgáltuk az összefüggést a CTLA4 génvariánsok és a β -sejt autoantitestek kialakulása között, s nem tudtunk asszociációt kimutatni (Hermann et al, Diabetologia 2005.). A CTLA4 valószínűleg a celluláris immunitás oldalán kapcsolódik be a T1D pathomechanizmusába, azonban erről nagyon kevés részlet ismert.

4. A genetikai szűrési modell

A pályázat egyik fő célja a magyar népességre alkalmazható genetikai szűrési stratégia kidolgozása volt az 1-es típusú diabetesre magas rizikójú egyének azonosítására. A munka első fázisában a HLA Class II adatok segítségével sikerült a DQB1 gén rizikó alléljein alapuló genetikai szűrési modellt 3 lépcsős modellé alakítani (Hermann et al. Diabetes Metabolism Research and Reviews 2004, 20:322-329.). Ez a stratégia magasabb szenzitivitású és specifitású mint a pusztán DQB1 génvariációk vizsgálatára épülő genetikai szűrés (Ilonen et al. Diabetes Care 1996).

A következő lépésként egy multistage rizikó becslésre alkalmas modell került kifejlesztésre, mely anyagból készült kézirat jelenleg elbírálás alatt áll (BMC Genetics). A kézirat absztraktja a 3. appendixben olvasható. A szűrési modellnek két változata van. Az egyik az átlagpopulációra a másik a diabeteses gyermekek első fokú rokonaira alkalmazható. A két modell a 2. illetve a 3. ábrán látható részleteiben.

Az 1. modellben (2. ábra) 3 fő rizikó csoport kerül azonosításra az első lépésben egy homogén PCR assay-vel: 1) A DQB1*02 hordozók 2) a DQB1*0302 hordozók 3) és a DQB1*02/DQB1*0302 heterozigóták. Ezeken a mintákakon azután a kiterjesztett HLA haplotípus és az azokhoz kapcsolódó differenciált genetikai rizikó meghatározására szekunder kiterjesztett DQB1, DQA1 és DRB1*04 tipizálás történik. Az első fokú rokonok esetében egy 4. fő csoport is bekerül a további tipizálási folyamatba, ezek azok a személyek akik a HLA DQB1*0302 allél mellett a DQB1*05/6 allélcsoportra is pozitívak (3. ábra).

Tekintettel arra, hogy ez a téma a pályázat munkatervében kiemelt jelentőségű, ezt a kéziratot csatolom a beszámolóhoz (Appendix 4).

4.a Klinikai követési protokoll

Fontos megemlíteni, hogy a genetikai szűréshez kapcsolódó genetikai rizikóbecslés klinikai felhasználhatóságának segítésére, vállalásainkon túlmenve, egy szakmai protokoll került kidolgozásra.

A protokollt a Magyar Diabetes Társaság Gyermekdiabetes Szekciójának vezetősége elfogadta. A protokoll a 3. Appendixben olvasható. Ez a protokoll a HUN-T1D-GENES program honlapjáról a résztvevő kollégák részére fenntartott és jelszóval védett menüpontból letölthető. A magas rizikójú gyermekek követésével, valamint a genetikai rizikó interpretációjával kapcsolatosan három közlemény született (Nagy-Szakáll et al, Gyermekgyógyászat 2007, nyomtatásban; Lukács et al. Gyermekorvos Továbbképzés, 2007, nyomtatásban; Hermann R. Gyermekorvos Továbbképzés, 2005. Szeptember, 174-175.)

5. A neonatalis diabetes formák genetikai háttere

Az alprogram keretében összesen 12 beteg és a családtagok mintáit sikerült begyűjtenünk a 3 év alatt. (A kórkép incidenciája kb. 1/400.000 szülés, azaz Magyarországon 4 évente születik egy páciens).

A páciensek között 7 permanens és 5 transiens diabeteses beteg van. E betegeknel szekvenáltuk a KCNJ11 kálium csatorna gént (OMIM No: 600937).

Egy páciensnél sikerült heterozigóta formában kimutatni az R201H (Arg/His) missense mutációt, illetve 2 másik PNDM betegnél találtunk egy eddig nem publikált polimorfizmust. Ez utóbbi esetében a normál populációból szekvenáltunk 54 mintát, amelyekben a mutáció nem volt jelen. Jelenleg e variáns funkcionális karakterizálása folyik Prof. A. Hattersley-vel együttműködésben (Birmingham, UK).

6. Publikációs aktivitás összefoglalása

Tudományos közlemények

A kutatási program során 20 a témához szorosan kapcsolódó publikáció született, további 4 kézirat elbírálás alatt áll. A jelen OTKA kutatási program eredményeiből elfogadott publikációk kummulatív impakt faktora 18.36.

A fenti beszámolóban egy közlemény eredményeit nem ismertettem részletesen (Makela, J Autoimmunity, 2006). Ebben a munkában az OTKA pályázat témájához kapcsolódó, de a munkatervben közvetlenül nem szereplő kutatás szerepelt.

Szakmai protokoll

A magas genetikai rizikójú gyermekek követésére szakmai protokoll került kidolgozásra. A protokollt a Magyar Diabetes Társaság Gyermekdiabetes Szekciójának vezetősége elfogadta. A protokoll a 3. Appendixben olvasható. Ez a protokoll a HUN-T1D-GENES program honlapjáról a résztvevő kollégák részére fenntartott és jelszóval védett menüpontból letölthető.

Internet publikáció, HUN-T1D-GENES honlap

A HUN-T1D-GENES program saját honlappal rendelkezik, melyet a témavezető és munkacsoportja naprakészen tart (www.diabet.hu/diabetesgenetics).

Kongresszusok

1. A) 2006-ban a Magyar Diabetes Társaság országos kongresszusán a diabetes genetikai szimpóziumon, valamint B) 2006-ban Gyulán a Gyermekdiabetes Szekció éves ülésén elhangzottak a fontosabb eredmények és a program ismertetése. C) A European Association for the Study of Diabetes 2006. évi kongresszusán a témavezető meghívott előadást tartott Koppenhágában a PTPN22 gén és a T1D összefüggéséről. Az előadásban az OTKA témából származó magyar adatok is bemutatásra kerültek.
2. A program résztvevőinek 3 fél napos szimpóziumot szervezett a program vezetője 2005-ben és 2006-ban. Helyszín a Semmelweis Egyetem 1. sz. Gyermekklinikája volt (időpontok: 2005 március 19, október 28, 2006 május 18-án). E szimpóziumokon a T1D genetikai háttéréről, jelen kutatási program előre haladásáról illetve a folytatás módjáról hangzottak el előadások. Mindhárom szimpóziumon részt vett az együttműködő finn centrumok vezetői közül Prof. Jorma Ilonen is. 2006-ban készülni fog egy kiadvány a szülők és páciensek részére a diabetes öröklődéséről, illetve a rizikó értelmezéséről

7. Az eredmények összegzése

Az OTKA pályázat munkatervében kitűzött célok megvalósultak, egyes célkitűzéseket sikerült a vártnál tovább is fejleszteni. A program az elmúlt három év alatt országos diabetes genetikai projektté nőtte ki magát (HUN-T1D-GENES program; www.diabet.hu/diabetesgenetics).

Az elért kutatási és a gyakorlatban hasznosítható eredmények felsorolása

1. Kiterjedt genetikai vizsgálatokat végeztünk több mint 1400 1-es típusú diabeteses gyermekben és családtagjaikban. A HLA vizsgálatok során több mint 340 magas rizikójú, még nem diabeteses gyermeket azonosítottunk.
2. Karakterizáltuk az 1-es típusú diabetes HLA Class II, valamint 2 új non-Class II fogékonysági genetikai faktorát (HLA B39, C4B) a magyar populációban.
3. Meghatároztuk három fontos non-HLA gén (INS, CTLA4, PTPN22) által kódolt genetikai rizikó mértékét, és azok részvételét az autoimmune folyamat kontrolljában.
4. Kidolgoztunk egy a magyar népességre alkalmazható komprehenzív populációsűrési modellt mellyel azonosíthatók az 1-es típusú diabetesre magas rizikójú egyének.

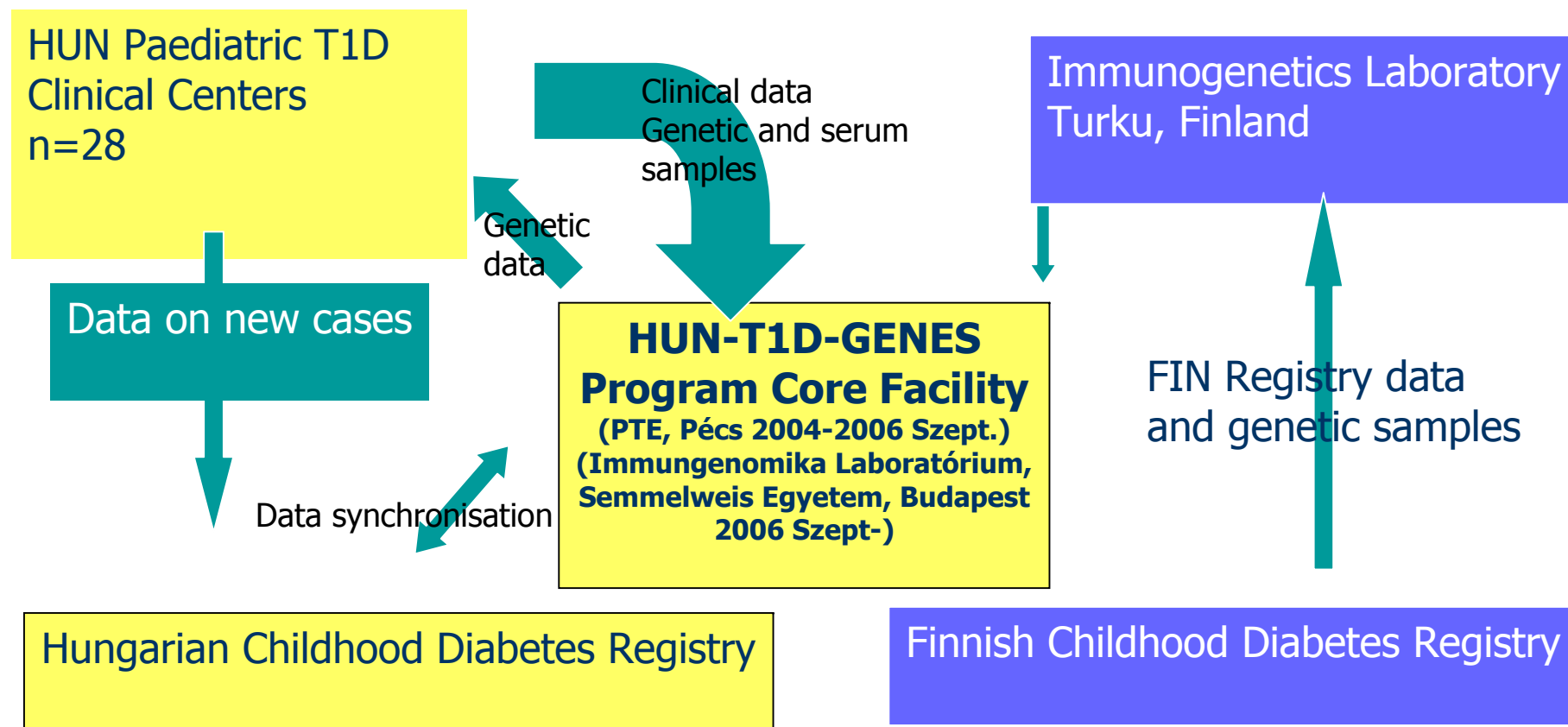
5. Kidolgoztunk egy a klinikai gyakorlatban használható protokollt, mely segítséget nyújt a klinikusoknak a diabetesre magas rizikójú gyermekek klinikai követésére. Ez a protokoll elősegíti azt hogy az 1-es típusú diabetes korábban kerüljön felismerésre ezekben a gyermekekben. Ezáltal csökkenthető a korai mortalitás és morbiditás ebben a csoportban (Diabetes Care 27:1399–1404, 2004).
6. A KCNJ11 gén esetében egy új génvariánst azonosítottunk egy neonatalis diabetes-es páciensben.

8. Ábrák és táblázatok

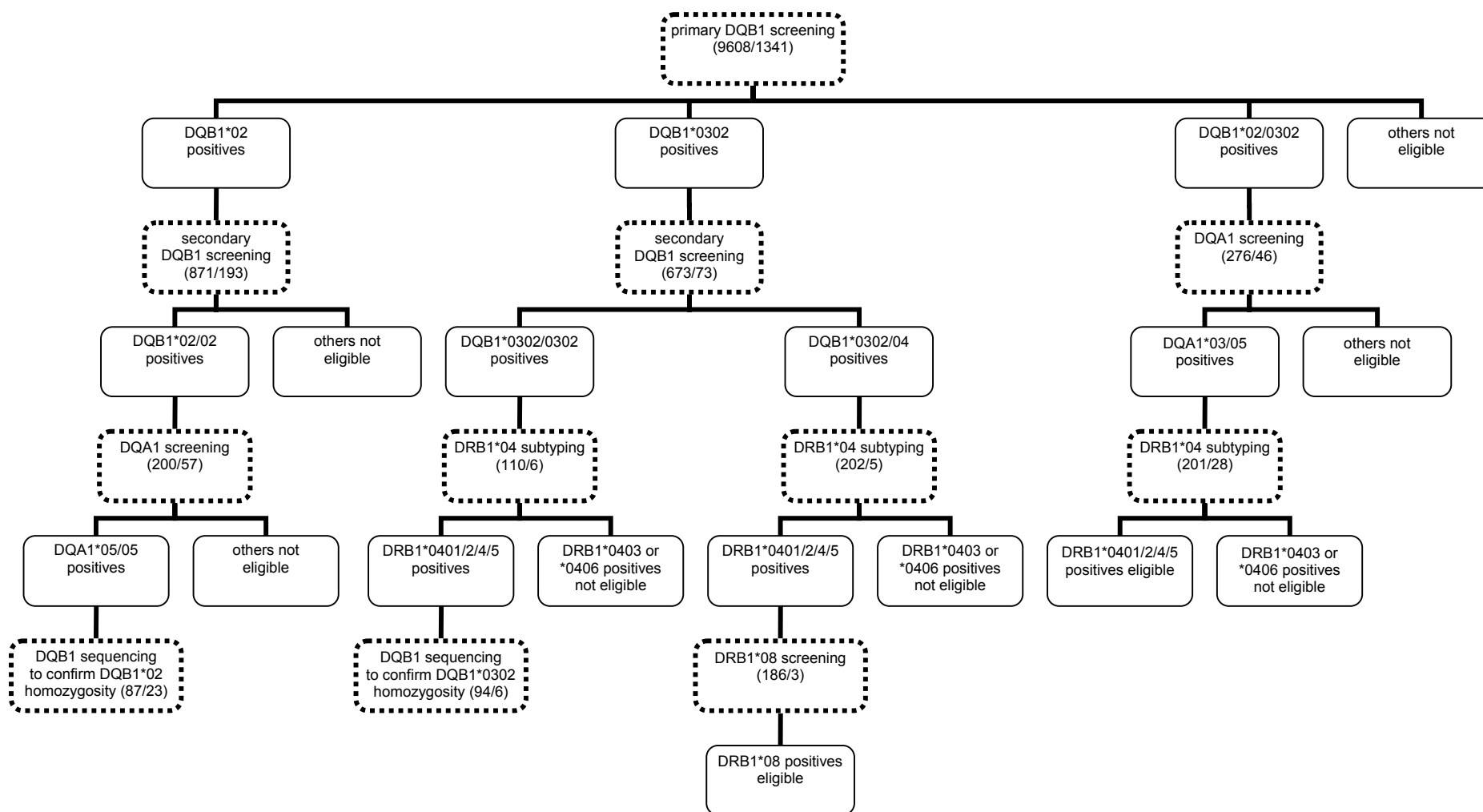
1. Táblázat A HUN-T1D-GENES programhoz csatlakozott gyermekdiabetes centrumok listája

No.	Kód	Kórház/Klinika neve	Város	T1D esetszám	Régió	Kollaborátor neve	
1	DREX	Madarasz utcai Gyermekkorház	Budapest	50	Budapest	Drexler	Miklós
2	HEIM	Heim Pál Kórház	Budapest	120	Budapest	Czinner	Antal
3	GYOR	Petz Aladár Megyei Kórház	Győr	100	Győr-Moson-Sopron megye	Niederland	Tamás
4	SZOH	Markusovszky Megye Kórház	Szombathely	85	Vas megye	Balogh	Márta
5	PECS	PTE Gyermekklinika	Pécs	362	Baranya megye	Soltész	Gyula
6	MISK	BAZ Megyei Kórház Gyermekkegészségügyi Központ	Miskolc	100	Borsod-Abaúj-Zemplen megye	Barkai	László
7	DEBR	DOTE Gyermekklinika	Debrecen	60	Hajdu-Bihar megye	Felszeghy	Enikő
8	BPSE	SE I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika	Budapest	430	Pest/Budapest	Madácsy	László
9	BUDA	Fővárosi Önkormányzat Budai Gyermekkorház	Budapest	100	Budapest	Blatniczky	László
10	BPSG	SE II. sz. Gyermekklinika	Budapest	60	Pest/Budapest	Hosszú	Éva
11	BETH	Magyar Református Egyház Bethesda Gyermekkorháza	Budapest	40	Budapest	Szabó	Ildikó
12	TATA	Szent Borbála Kórház	Tatabánya	40	Komárom megye	Kocsis	Katalin
13	VSZP	Veszprém Megyei Csolnoky Ferenc KH	Veszprém	40	Veszprém megye	Gajzer	Éva
14	KAPV	Somogy Megyei Kaposi Mór Oktató Kórház	Kaposvár	35	Somogy megye	Dósa	Magdolna
15	STAR	Szent Lázár Megyei KH	Salgótarján	15	Nógrád megye	Godó	Béla
16	HMVH	Hódmezővásárhelyi Erzsébet Kórház	Hódmezővásárhely	20	Hódmezővásárhely	Szűts	Péter
17	GYUL	Gyulai Kórház	Gyula	40	Békés megye	H. Nagy	Katalin
18	SZEG	Szegedi Gyermekkorház	Szeged	100	Csongrád megye	Kürti	Kálmán
19	SZOL	Jász-Nagykun-Szolnok Megyei Hetényi Kórház	Szolnok	40	Jász-Nagykun-Szolnok megye	Némedi	Mária
20	KECS	Bács-Kiskun Megyei Önkormányzat Kórháza	Kecskemét	50	Bács-Kiskun megye	Góg	Erzsébet
21	DBCN	Debreceni Gyermekkorház	Debrecen	40	Hajdu-Bihar megye	Tóth	Tamás
22	BCSB	Réthy Pál Megyei KH	Békéscsaba	50	Békés megye	Somlai	Rozália
23	ZALA	Zalaegerszegi Megyei KH	Zalaegerszeg	50	Zala megye	Buzogány	Mária
24	SZFV	Fejér Megyei Szt. György Korház	Székesfehérvár	100	Fejér megye	Karádi	Zsuzsanna
25	SZEK	Tolna Megyei Önkormányzat Balassa János Kórháza	Szekszárd	50	Tolna megye	Rippl	Ilona
26	NYIR	Jósa András Kórház	Nyíregyháza	100	Szabolcs-Szatmár megye	Kántor	Irén
27	EGER	Heves Megyei Markhót F. KH	Eger	40	Heves megye	Petheő	István

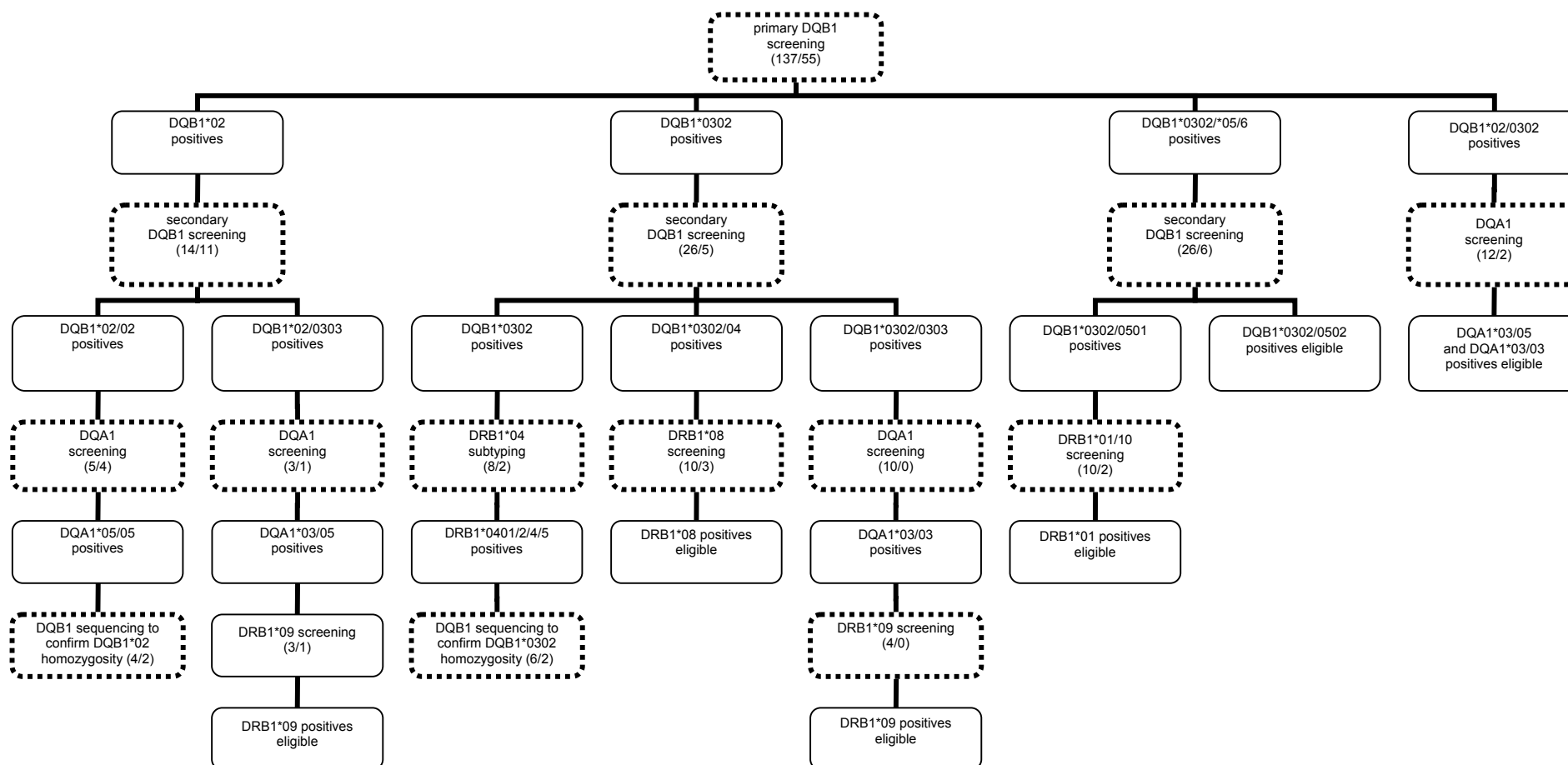
1. Ábra A HUN-T1D-GENES program szerkezete, és működési sémája



2. Ábra A HLA genetikai szűrési modell, és annak egyes elemei az átlagpopulációra alkalmazva.



3. Ábra A HLA genetika szűrési modell, és annak lépései diabeteses páciensek elsőfokú rokonaira alkalmazva



2. táblázat: A HLA DRB1-DQA1-DQB1 haplotípusok társulása 1-es típusú diabétesszel a magyar populációban (Hermann et al. publikálás alatt; HUN-T1D-GENES program). A hajlamosító haplotípusok narancs, a védő haplotípusok kék mezőben szerepelnek.

HLA Haplotípusok	T1D esetek n=1605 %	Kontrollok n=1479 %	Relatív rizikó
DRB1*0408-DQA1*03-DQB1*0304	2,1	0,3	7,2
DRB1*04 - DQB1*0302	30,1	8,0	4,9
DRB1*0405-DQB1*0302	1,6	0,1	16,5
DRB1*0401-DQB1*0302	15,8	3,0	6,1
DRB1*0402-DQB1*0302	6,7	1,4	5,1
DRB1*0404-DQB1*0302	4,7	2,1	2,3
DRB1*0405-DQA1*03-DQB1*0201	1,8	0,5	3,7
DR3-DQA1*05-DQB1*0201	33,4	12,3	3,6
DRB1*0408-DQB1*0302	0,3	0,1	
DR9-DQA1*03-DQB1*0303	1,1	0,5	
DR8-DQB1*04	2,6	2,4	
DR16-DQB1*0502	6,2	7,6	
DR13-DQB1*0604	2,4	2,9	
DR1/10-DQA1*01-DQB1*0501	9,1	11,4	
DR4-DQA1*0301-DQB1*0301	1,3	2,4	0,5
DR7-DQA1*0201-DQB1*0201	2,7	9,0	0,3
DR13-DQB1*0603	1,6	6,6	0,2
DR14-DQB1*0503	0,9	4,0	0,2
DR15-DQB1*0601	0,2	1,5	0,2
DR11/12/13-DQA1*05-DQB1*0301	3,9	21,6	0,1
DR7-DQA1*0201-DQB1*0303	0,2	2,5	0,1
DRB1*0403-DQB1*0302	0,1	0,9	0,1
DR15-DQB1*0602	0,3	6,4	<0,1

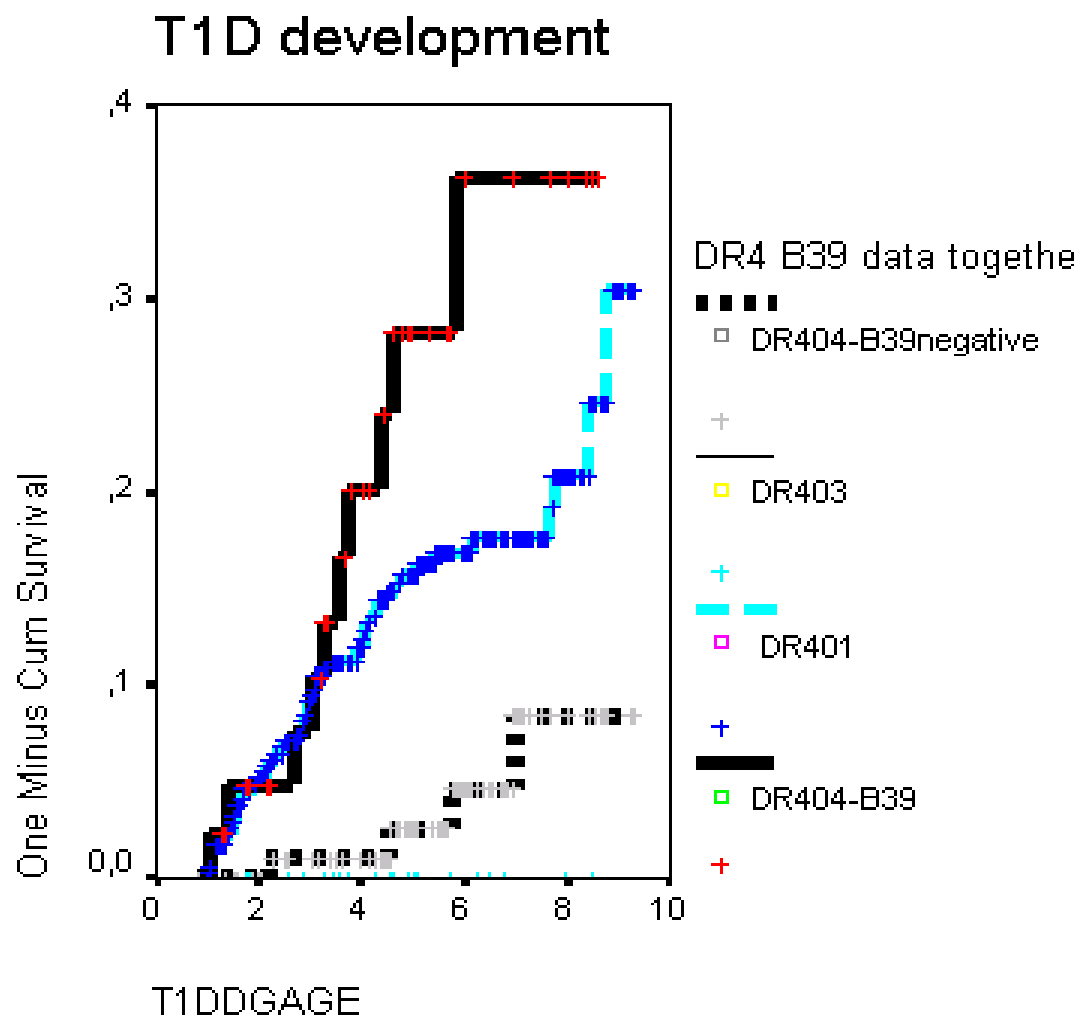
A HLA molekulák nevezéktanában az első betű jelöli az osztályt (pl. D esetén HLA II. osztályról van szó), a második betű a géncsalád nevét (M, O, P, Q vagy R), a harmadik betű pedig azt, hogy melyik polipeptidláncról (A vagy B) van szó. Az adott gént az ezt követő arab szám jelöli, majd egy csillaggal elválasztva a megfelelő allélvariánsra utaló szám következik. Pl. HLA DRB1*0401 jelentése: HLA II. osztály, R család, β -lánc, 1-es gén, 0401-es variáns.

3. táblázat: A HLA DRB1-DQA1-DQB1 genotípusok társulása 1-es típusú diabétesszel a magyar populációban (Hermann et al. nem publikált adatok; HUN-T1D-GENES program). A hajlamosító kombinációkat narancs míg a védő kombinációkat kék szín jelzi.

HLA Genotípus		T1D n=810 %	Kontrollok n=702 %	Relatív rizikó
DR3-DQA1*05-DQB1*0201	DR4-DQB1*0302	28,2	2,9	13,0
DR4-DQB1*0302	DR4-DQB1*0302	3,8	1,5	2,4
DR3-DQA1*05-DQB1*0201	DR3-DQA1*05-DQB1*0201	8,6	1,3	6,5
DR4-DQB1*0302	DR7-DQA1*0201-DQB1*0201	2,3	1,1	
DR4-DQB1*0302	DR11-13-DQA1*05-DQB1*0301	2,6	3,8	
DR4-DQB1*0302	DR8-DQB1*04	2,9	0,8	3,5
DR4-DQB1*0302	DR1/10-DQA1*01-DQB1*0501	4,8	1,5	3,1
DR4-DQB1*0302	DR16-DQB1*0502	3,2	0,6	5,0
DR4-DQB1*0302	DR14-DQB1*0503	0,3	0,8	
DR4-DQB1*0302	DR15-DQB1*0602	0,5	0,4	
DR4-DQB1*0302	DR13-DQB1*0603	2,3	0,6	3,6
DR4-DQB1*0302	DR13-DQB1*0604	1,1	0,4	
DR3-DQA1*05-DQB1*0201	DR7-DQA1*0201-DQB1*0201	1,2	1,5	
DR3-DQA1*05-DQB1*0201	DR11-13-DQA1*05-DQB1*0301	1,1	5,9	0,2
DR3-DQA1*05-DQB1*0201	DR8-DQB1*04	1,1	0,4	
DR3-DQA1*05-DQB1*0201	DR1/10-DQA1*01-DQB1*0501	5,4	2,9	1,9
DR3-DQA1*05-DQB1*0201	DR16-DQB1*0502	5,3	1,0	5,3
DR3-DQA1*05-DQB1*0201	DR14-DQB1*0503	0,2	0,6	
DR3-DQA1*05-DQB1*0201	DR15-DQB1*0602	0,0	1,7	<0,1
DR3-DQA1*05-DQB1*0201	DR13-DQB1*0603	0,3	1,0	0,4
DR3-DQA1*05-DQB1*0201	DR13-DQB1*0604	1,7	0,8	
DR11-13-DQA1*05-DQB1*0301	DR11-13-DQA1*05-DQB1*0301	0,6	3,4	0,2

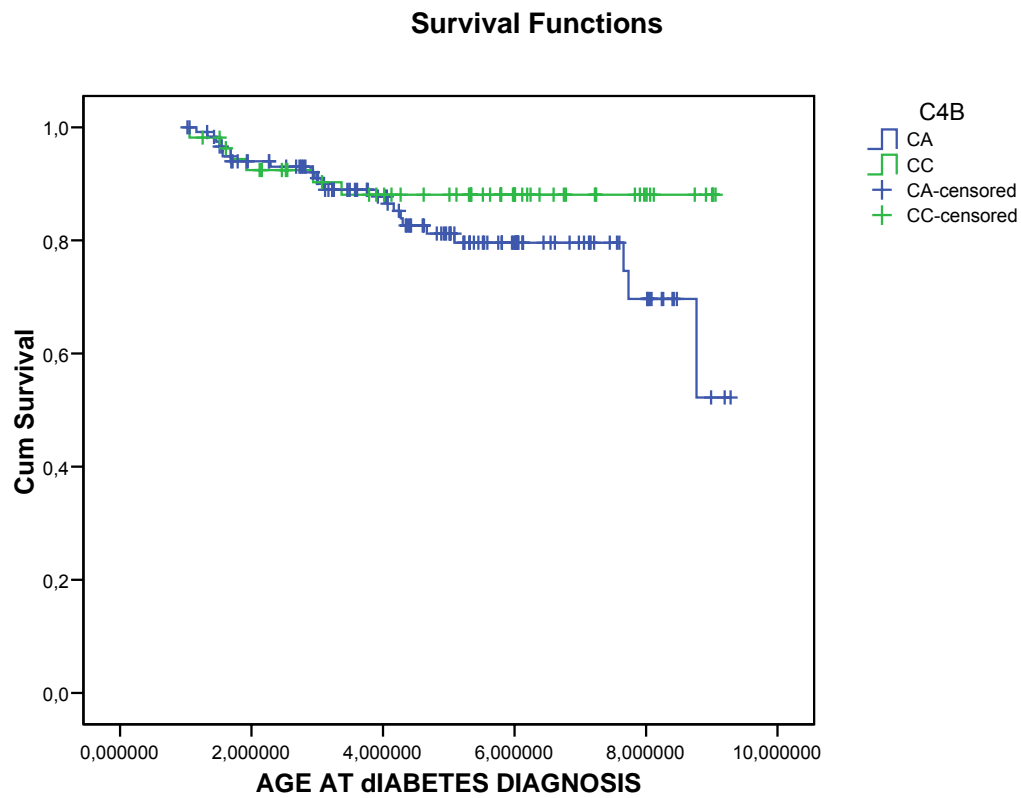
4.Ábra

A HLA B39 allél jelenléte fokozza a diabetes rizikóját azokban a személyekben akik pozitívak a DRB1*0404-DQB1*0302 haplotípusra. Az ábrán Kaplan-Meyer analízis, (one minus survival curve) látható.



5.Ábra

A HLA C4BX allél jelenléte fokozza a diabetes rizikóját azokban a személyekben akik pozitívak a HLA B62-DRB1*0401 haplotípusra. Az ábrán Kaplan-Meier analízis, (survival curve) látható.



Appendix 1.

Abstract of
Manuscript submitted to Diabetes, 2007

HLA B39 affects the type 1 diabetes predisposing effect of DRB1*0404-DQB1*0302 haplotypes

K. Lipponen¹, Z. Gombos¹, A-P. Laine¹, O. Simell², M. Knip^{3,4}, R. Hermann^{1,5}, J. Ilonen^{1,6}

¹University of Turku, Department of Medical Microbiology, Turku, Finland; ²Department of Paediatrics, Turku University Hospital, Turku, Finland; ³Department of Paediatrics, Tampere University Hospital, Tampere, Finland; ⁴Hospital for Children and Adolescents, University of Helsinki, Helsinki, Finland; ⁵Semmelweis University, Budapest, Hungary; ⁶University of Kuopio, Department of Clinical Microbiology, Kuopio, Finland

Background

An autoimmune attack against the insulin-producing β -cells of the pancreas precedes the manifestation of clinical type 1 diabetes (T1D). The genetic factors regulating this process are poorly characterised. The main factors are DQB1-, DRB1- and DQA1- genes in human leukocyte antigen (HLA) Class II area. However, several studies support the modifying role of HLA Class I variants.

Aims

To characterize Class I modifiers of the DRB1*0404-DQB1*0302 haplotypes in relation to T1D risk and to emergence of humoral β -cell autoimmunity.

Subjects

We analysed 1205 Hungarian T1D nuclear families to explore disease association of various HLA Class I alleles. Additionally, 303 ICA-positive children who were identified in a population-based genetic screening. All individuals carried the DQB1*02/*0302 or *0302/x (x \neq *02, *0301, *0602) risk genotypes. Mean follow-up time was 5.46 years. Study subjects were further tested for insulin, IA2 and GAD autoantibodies and genotyped for HLA DRB1-DQA1-DQB1, HLA-B and for the insulin gene HphI promoter polymorphism.

Results

The DRB1*0404-DQB1*0302-HLA-B*39 and DRB1*0404-DQB1*0302-non-HLA-B*39 haplotypes conferred significantly different T1D risks, the haplotype carrying HLA-B*39 being more predisposing (HR: $p < 0,0001$). These haplotypes also had a differential effect on the appearance of insulin autoantibodies ($p = 0,0001$). This effect was independent of the insulin gene polymorphism. The presence of HLA-B*39 did not affect emergence of GADA and IA-2A.

Conclusion

For the first time we showed that B*39 allele on the DRB1*0404-DQB1*0302 haplotype affects appearance of diabetes-related autoantibodies and progression to clinical disease. Importantly, its primary effect appears to be on insulin-specific autoimmunity. It is further investigated whether the B*39 allele itself or a gene in the surrounding genomic region is responsible for this phenomenon.

Appendix 2.

Abstract of
Manuscript submitted to J. Of Autoimmunity

Reduced CD4+ T-cell activation in children with type 1 diabetes carrying the PTPN22/Lyp 620Trp variant

J. Aarnisalo^{1,2}, A. Treszl³, J. Marttila^{1,2}, V. Öling^{1,2}, P. Svec⁴, O. Simell⁵, M. Knip^{6,7}, A. Körner³, L. Madacsy³, B. Vasarhelyi³, J. Ilonen^{1,8}, R. Hermann^{1,9}

- 1) Immunogenetics Laboratory, University of Turku, Turku, Finland
- 2) Department of Virology, University of Turku, Turku, Finland
- 3) 1st Department of Pediatrics, Semmelweis University, Budapest, Hungary
- 4) 2nd Department of Pediatrics, Comenius University School of Medicine, Bratislava, Slovakia
- 5) Department of Pediatrics, University of Turku, Turku, Finland
- 6) Department of Pediatrics, Tampere University Hospital, Tampere, Finland
- 7) Hospital for Children and Adolescents, University of Helsinki, Helsinki, Finland
- 8) Department of Clinical Microbiology, University of Kuopio, Kuopio, Finland
- 9) Immunogenomics Laboratory, CellScreen Applied Biomedical Research Center, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Corresponding author
Johanna Aarnisalo, MD
University of Turku, Immunogenetics Laboratory
Medicity, BioCity 4th floor, Tykistökatu 6, 20520 Turku, Finland
Phone: +358-2-3337010
Fax: +358-2-3337000
Email: johanna.aarnisalo@utu.fi
Word count: abstract 245, main text 3969

Abstract

Aims The Arg620Trp polymorphism of the lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) gene, which encodes the LYP protein, is associated with type 1 diabetes (T1D) and insulin-specific autoimmunity. In this study we aimed at characterising the role of this variant on lymphocyte activation.

Methods We analysed cytokine secretion and proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and CD4⁺ T cells in a cohort of clinically non-diabetic, multiple autoantibody-positive children with HLA-conferred susceptibility to T1D and in children with T1D. The frequency of regulatory T cells in subjects with different PTPN22 genotypes was also analysed.

Results We found a profoundly decreased intracellular calcium flux in CD4⁺ T cells after PHA stimulus in diabetic children carrying the PTPN22 620Trp variant. In the same group a decreased proliferation and IL-2 secretion of CD4⁺ T cells was observed after anti-CD3/CD28 stimulation ($p=0.04$ for IL-2). In contrast, no effect of this polymorphism on tuberculin and tetanus toxoid induced PBMC proliferation and on cytokine secretion of PBMCs was observed in autoantibody positive children. Importantly, we found no difference in the frequency of the FoxP3 positive regulatory T cells between diabetic patients carrying different PTPN22 genotypes.

Conclusions For the first time we showed that the PTPN22 620Trp variant is associated with reduced activation, proliferation and IL-2 production in human CD4⁺ T cells. In accordance with our previous findings on the key role of this variant on disease progression, this mechanism is likely to contribute to the development of β -cell specific autoimmunity.

Appendix 3.

HUN-T1D-GENES program Követési Protokoll

Készítette: Dr. Hermann Róbert
2006-04-19

1-es típusú diabeteses gyermekek testvéreinek követési protokollja

E protokoll célja, hogy segítse az 1-es típusú diabetes (T1D) korai diagnózisát T1 diabeteses gyermekek testvérei esetében. Ismert, hogy a prediabetes azonosítása genetikai, immunológiai és metabolikus vizsgálatok segítségével megkönnyíti a T1D korai diagnózisát. Finn (DIPP vizsgálat) és amerikai (DAISY) (1) tanulmányok szerint a követett prediabeteses gyermekek esetében a T1D diagnózisakor alacsonyabb volt a vércukor szint, jóval ritkább és enyhébb volt a diabeteses ketoacidózis, valamint annak szövődményei. Emellett e gyermekek alacsonyabb inszulin adaggal voltak kezelhetők az első évben, a nagyobb reziduális béta-sejt tömeg miatt. A normoglikémiához közelebb eső vércukorátlag tükröződött a jobb HbA1c értékekben is.

A protokoll az elmúlt néhány év hazai és nemzetközi vizsgálatainak eredményein alapul: Magyar Gyermeke diabetes Genetikai és Immunológiai Kutatási Program (www.diabet.hu/diabetesgenetics) és a korábban publikált magyar adatok (2-4), Childhood Diabetes in Finland Study Group, (5), Belgian Diabetes Registry (6-8), a Type I Diabetes Prediction and Prevention Project (DIPP) (9-11).

A táblázatban megadott genetikai rizikó kategória a HLA DRB1-DQA1-DQB1 adatokra épül. Mivel nemcsak magas és közepes rizikójú gyermekek esetében alakul ki T1D, hanem bizonyos esetekben semleges vagy védő genotípussal is, javasolt minden testvér egyszeri antitest vizsgálata, a protokollban rögzítetteknek megfelelően. Megemlítenő, hogy a genetikai rizikó értékelésekor a diabetes testvérrel való HLA azonosság jelentősen fokozza a betegség rizikóját: Ezért minden HLA identikus testvér védő (0) és semleges (1) genotípussal a közepes rizikójú (2) csoportba sorolandó, míg a közepes genetikai rizikójú (2) HLA identikus testvérek a magas rizikójú (3) csoportnak megfelelően kerülnek követésre. A testvérekre vonatkozó, és a centrumoknak kiadott genetikai rizikó adatok már ennek figyelembevételével lettek meghatározva.

HLA genetikai rizikó	Autoantitest status (ICA, IAA, GADA, IA-2A) Ab=autoantitest	Diabetes rizikó kategória	Abszolút rizikó T1D kialakulására 15 éves korig %	Teendők	Követési időintervallum (max)
E Emelkedett genetikai rizikó	Negatív vagy ICA 0-15 JDFU	3	5-10 %	Autoantitest minta	12 hónap
	1 Ab pozitív de IA-2A negatív (ICA > 15 JDFU, vagy IAA, vagy GADA pozitív) ha IA-2A pozitív = rizikó kategória 6	4	20-30 %	1. Klinikai felmérés 2. Autoantitest minta	6 hónap 3 hónap ha <5 éves vagy HLA azonos
	2 vagy több Ab pozitív (vagy IA-2A pozitív)	6	> 70%	1. Klinikai felmérés 2. Autoantitest minta	3 hónap (OGTT minden 6 hó.- ban)
K Közepes genetikai rizikó	Negatív vagy ICA 0-15 JDFU	2	1-4 %	Autoantitest test	12 hónap
	1 Ab pozitív de IA-2A negatív (ICA > 15 JDFU, vagy IAA, vagy GADA pozitív) ha IA-2A pozitív = rizikó kategória 6	4	20-30 %	1. Klinikai felmérés 2. Autoantitest minta	6 hónap 3 hónap ha <5 éves vagy HLA azonos
	2 Ab pozitív (IA-2A negatív)	5	50-70 %	1. Klinikai felmérés 2. Autoantitest minta	3 hónap (OGTT minden 6 hó.- ban)
	3 vagy mvagy Ab pozitív vagy IA-2A pozitív	6	> 70 %	1. Klinikai felmérés 2. Autoantitest minta	3 hónap (OGTT minden 6 hó.- ban)

Az autoantitest minta vételre a “Protokoll szérum minta gyűjtéséhez” használandó.

HLA genetikai rizikó	Autoantitest status (ICA, IAA, GADA, IA-2A) Ab=autoantitest	Diabetes rizikó kategória	Abszolút rizikó T1D kialakulására 15 éves korig %	Teendők	Követési időintervallum (max)
S Semleges genetikai rizikó kategória	Negatív vagy ICA pos <15 JDFU)	1	0.3 %	Autoantitest minta	12 hónap
	1 Ab pozitív de IA-2A negatív (ICA > 15 JDFU, vagy IAA, vagy GADA pozitív) ha IA-2A pozitív = rizikó kategória 6	2	1-4 %	1. Klinikai fel mérés 2. Autoantitest minta	6 hónap
	2 Ab pozitív (vagy csak az IA-2A pozitív)	4	20-30 %	1. Klinikai fel mérés 2. Autoantitest minta	6 hónap 3 hónap ha <5y vagy HLA azonos
	3 vagy m v a g y e Ab pozitív vagy IA-2A +1 Ab pozitív	6	> 70 %	1. Klinikai fel mérés 2. Autoantitest minta	3 hónap (OGTT minden 6 hó.- ban)
A Alacsony genetikai rizikó	Negatív (vagy ICA pos <15 JDFU)	0	<0.01%	Nincs követés ha 10 évesnél idősebb.	
				Ha < 10 éves: Autoantitest minta	24 hónap
	1 Ab pozitív de IA-2A negatív (ICA > 15 JDFU, vagy IAA, vagy GADA pozitív) ha IA-2A pozitív = rizikó kategória 6	1	0.3 %	1. Klinikai fel mérés 2. Autoantitest minta	12 hónap
	2 Ab pozitív (vagy csak az IA-2A pozitív)	4	20-30 %	1. Klinikai fel mérés 2. Autoantitest minta	12 hónap 6 hónap ha <5y vagy HLA azonos
	3 vagy több Ab pozitív vagy IA-2A pos. + 1 Ab	6	> 70%	1. Klinikai fel mérés 2. Autoantitest minta	3 hónap (OGTT minden 6 hó.- ban)

Klinikai felmérés autoantitest pozitív gyermekekben a diabetes rizikó pontosítására

Anamnézis, fizikális vizsgálat, diabetesre specifikus panaszok és tünetek keresése
Éhgyomri vércukor vizsgálat manifest diabetes kizárására (ha a capillaris vagy vénás teljes vérből mért glucose érték > 6.7 mM, diabetes valószínű és ennek megfelelően kell tovább lépni)

Ha az éhgyomri vércukor normális, OGTT következik:

ha IGT azonosítható, a diabetes rizikó kategória 6 (T1D rizikó 70%-nál nagyobb 15 éves korig)

ha OGTT normális, akkor a IVGTT mérlegelhető.

IVGTT (jelentősége: autoantitest pozitív gyermekek kb. 30%-ban kóros a korai insulin válasz-FPIR)

ha FPIR csökkent akkor a gyermek a 6-os rizikó csoportba tartozik (T1D rizikó 70%-nál nagyobb 15 éves korig)

ha a FPIR normális, a rizikó kategória nem változik.

Fontos:

IVGTT-t pozitív serokonverzió esetén egy alkalommal javasolt végezni. Ha FPIR kórosan csökkent, akkor az IVGTT későbbi megismétlése reklaszifikáció céljából nem javasolt, ugyanis nem szokott változni pozitív irányba. Ha a FPIR normális, akkor abban az esetben mérlegelhető a megismétlése, ha az autoimmunitás progrediál, azaz újabb autoantitestek jelennek meg.

Fontos:

Autoantitest pozitivitás definíciója: Pozitív immunszerológiai lelet két külön időpontban levett mintában. Az első pozitív minta esetén javasolt 3 hónapon belül levenni a második mintát.

Alacsony ICA titer (<15 JDFU) és alacsony IAA (insulin autoantitest) titer nem jelent emelkedett diabetes rizikót, önmagában.

IA-2A (islet antigen 2 autoantitest) pozitivitás jelentősen fokozza a diabetes rizikóját. Minden 5 év alatti gyermek, aki 2 vagy több autoantitestre pozitív automatikusan a 6-os rizikócsoportba kerül, és annak megfelelően szükséges követni.

5. Újabb adatok alapján a proinsulin/C-peptid arány használata mérlegelhető a residuális béta-sejt tömeg megítélésére (Diabetologia, 2005. 48(11): p. 2322-9). A protokollba nem került be, mivel a proinsulin és a C-peptid mérésére elterjedt különböző laboratóriumi metodikák összehasonlíthatóságáról e tekintetben nincs adat.

A különböző T1D rizikó csoportba tartozó gyermekek szüleinek adandó tanácsok

(Genetikai és immunológiai markerek együttes figyelembevételével történik a T1D rizikó csoport meghatározása).

T1D rizikó csoport	Abszolút rizikó 15 éves korig %	Szülőknek adandó Tanács
0	< 0.01	-
1	0.3	-
2	1-4	-
3	5-10	-
4	20-30	1. A diabetes tüneteit figyeljék. Observe diabetes symptoms 2. Diabetes tüneteinek gyanúja esetén vizelet glucose vizsgálat
5	50-70	1. A diabetes tüneteit figyeljék. Observe diabetes symptoms 2. Diabetes tüneteinek gyanúja esetén vizelet glucose vizsgálat
6	>70	1. A diabetes tüneteit figyeljék. 2. Vizelet glucose vizsgálat javasolt hetente 3 alkalommal ÉS diabetes tüneteinek gyanúja esetén

References

1. Barker, J.M., et al., Klinikai characteristics of children diagnosed with type 1 diabetes through intensive screening and follow-up. *Diabetes Care*, 2004. 27(6): p. 1399-404.
2. Hermann, R., et al., HLA alleles and IDDM in children in Hungary: a comparison with Finland. *Hum Immunol*, 2001. 62(4): p. 391-8.
3. Hermann, R. and G. Soltesz, Prevalence and HLA association of GAD65 antibodies in Hungarian schoolchildren. *Hum Immunol*, 2003. 64(1): p. 152-5.
4. Hermann, R. and G. Soltesz, [Predictive genetic screening fvagy type-1 diabetes in the Hungarian population]. *Vagyv Hetil*, 2004. 145(7): p. 337-42.
5. Kulmala, P., et al., Genetic markers, humvagyal autoimmunity, and prediction of type 1 diabetes in siblings of affected children. *Childhood Diabetes in Finland Study Group. Diabetes*, 2000. 49(1): p. 48-58.
6. Truyen, I., et al., Proinsulin levels and the proinsulin:c-peptide ratio complement autoantitest measurement fvagy predicting type 1 diabetes. *Diabetologia*, 2005. 48(11): p. 2322-9.
7. Decochez, K., et al., Combined positivity fvagy HLA DQ2/DQ8 and IA-2 antibodies defines population at high risk of developing type 1 diabetes. *Diabetologia*, 2005. 48(4): p. 687-94.
8. Decochez, K., et al., IA-2 autoantibodies predict impending type I diabetes in siblings of patients. *Diabetologia*, 2002. 45(12): p. 1658-66.
9. Kupila, A., et al., Feasibility of genetic and immunological prediction of type I diabetes in a population-based birth cohvagy. *Diabetologia*, 2001. 44(3): p. 290-7.
10. Hermann, R., et al., The effect of HLA class II, insulin and CTLA4 gene regions on the development of humvagyal beta cell autoimmunity. *Diabetologia*, 2005. 48(9): p. 1766-75.
11. Hermann, R., et al., PTPN22 lymphoid tyrosine phosphatase Arg620Trp variant regulates insulin autoimmunity and progression to type 1 diabetes. *Diabetologia*, 2006: p. in press.

Appendix 4.

Manuscript submitted to BMC Genetics, 2007

A high throughput population screening system for the estimation of genetic risk for type 1 diabetes

Minna Kiviniemi^{1*}, Robert Hermann², Jussi Nurmi³, Anette G. Ziegler⁴, Mikael Knip⁵, Olli Simell⁶, Riitta Veijola⁷, Timo Lövgren⁸, Jorma Ilonen^{1,9} and the TEDDY study group

¹Immunogenetics Laboratory and MediCity Research Laboratory, University of Turku, Tykistökatu 6 A, 4th floor, FIN-20520 Turku, Finland

²Immunogenomics Laboratory, Semmelweis University, Budapest, Hungary

³Abacus Diagnostica Oy, Turku, Finland

⁴Diabetes Research Institute and Hospital München-Schwabing, Munich, Germany

⁵Hospital for Children and Adolescents, University of Helsinki, Helsinki, Finland and Department of Pediatrics, Tampere University Hospital, Tampere, Finland

⁶Department of Pediatrics, University of Turku, Turku, Finland

⁷Department of Pediatrics, University of Oulu, Oulu, Finland

⁸Department of Biotechnology, University of Turku, Turku, Finland

⁹Department of Clinical Microbiology, University of Kuopio, Kuopio Finland

Background: In the TEDDY study patient eligibility is defined by the presence of some of the selected type 1 diabetes risk associated HLA-DR-DQ genotypes. A practical screening strategy was required with efficient exclusion of ineligible patients at an early stage. Also a simple, low-cost and fast screening system was needed for the primary step of the risk assessment including thousands of samples.

Methods: A homogeneous genotyping system utilizing an asymmetric PCR and subsequent hybridization of allele specific probes was designed to be used as the first screening step. This assay was combined with methods further elucidating the genetic risk of type 1 diabetes to screen for high-risk individuals.

Results: The homogeneous assay platform allows the typing of hundreds of samples within one working day. The costs of the assay are minimal and the reductions in hands-on time provide considerable improvements compared to the heterogeneous genotyping methods comprising of separate PCR and hybridization steps. The primary selection criteria used in the first step proved to be efficient since the numbers of samples typed in subsequent stages were markedly reduced.

Conclusions: The presented assay system provides a practical approach to the rapid screening of thousands of samples at low cost, a general starting point for large scale screening studies.

Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is a complex disease where environmental factors play a role in the development of the disease in subjects with inherited susceptibility. A large international effort, the TEDDY study (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young) was recently launched with the aim to explore the contribution of various environmental factors to disease development¹. In this project newborns with genetic susceptibility to T1D are identified in an initial screening step, and those found having defined risk haplotypes at increased risk are then monitored for emergence of autoimmunity and observed for various environmental exposures for up to 15 years. Our laboratory is performing genetic screening for the study cohort recruitment in Finland and Germany and for this purpose we have developed the methods and the model for the multistage genetic risk definition described here.

T1D susceptibility is defined by a number of genes with a major contribution of the HLA complex^{2,3}. The primary disease determinant is HLA-DQ molecule encoded by DQA1 and DQB1 genes but certain variants of the neighboring DRB1 genes also influence genetic type 1 diabetes susceptibility when they occur together with particular DQ alleles⁴. Consequently, HLA-encoded disease risk is best defined by the DRB1-DQA1-DQB1 haplotype combinations^{5,6}. The absolute disease risk associated with different HLA Class II genotypes ranges from 5-8 % to less than 0.01 %⁷. Eligibility for follow-up in the TEDDY study is defined by the presence of certain high risk associated genotypes, which are differently defined among newborns recruited from general population and among those with first-degree relatives (FDR) affected by T1D.

A simple, efficient and reliable screening system is required whenever embarking on a project involving the typing of thousands of samples. Here we describe a screening system designed to identify those individuals with a high genetic risk for developing T1D and eligible for the TEDDY study. An efficient and cheap primary screening step based on a homogeneous typing method uses whole blood dried on a sample collection card as a sample material. The whole assay can be performed in four hours with less than one hour of hands-on time and produces numerical results easily interpreted and incorporated to databases. The equipment needed for this assay consist of only a thermal cycler and a fluorescence counter, instruments that are common in many laboratories, thus adoption of the system to new laboratories is straightforward and rapid.

The steps following the homogeneous, primary screening are based on either a well-known DELFIA method (PerkinElmer Life and Analytic Sciences Wallac, Turku, Finland) or they are simple PCR assays based on allele specific amplification. Depending on the results of each of the typing steps a sample may require different kinds of additional typing as described in Figures 1 and 2.

Patients and methods

Finnish birth cohort: The general population sample from Finland comprised consecutive newborns (n=9608) from three cities, Turku, Tampere and Oulu. Dried blood spots taken at birth during the period from the 1st of November 2005 until the 30th of October 2006 were analyzed. Samples from siblings of children with type 1 diabetes were included in the first-degree relative cohort (n=137).

German birth cohort: The general population sample from Germany comprised 1341 consecutive newborns from Munich (study period: 13.09.200-30.10.2006). The FDRs were recruited through the BabyDiab network from Germany (n=55)8.

Hungarian family cohort: An additional set of FDRs were recruited from Hungary, using the framework of the nationwide HUN-T1D-GENES program. The family sample comprised 1232 T1D nuclear families.

Homogeneous HLA DQB1 screening system for stage 1 genetic risk assessment

A homogeneous genotyping system was developed to be used in the first step of the screening. The method is based on an asymmetrical PCR and a subsequent hybridization of allele specific probes^{9,10} and in this screening program it is used to differentiate the samples positive for the DQB1*02 and DQB1*0302 alleles as well as all those with DQB1*05 and DQB1*06 allele groups.

The oligonucleotides used in this study are described in Table 1. Amplifications were performed on ThermoFast® 96 plates (ABgene, Epsom, UK) and sealed with Microseal 'A' Sealing film (MSA5001, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The 25 µl reaction mixture contained 1.0 U 7T1 Taq polymerase (HyTest Ltd, Turku, Finland), 0,8X HyTest PCR buffer (HyTest Ltd) 4.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs (Fermentas Inc., Helsingborg, Sweden), 1.5 mol/L betaine (Acros Organics, Geel, Belgium), 1% DMSO (dimethyl sulfoxide) (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), 0.6 µmol/L DQB1 5' primer and 0.15 µmol/L DQB1 3' primer.

Two probe-quencher pairs were used in each reaction and the concentrations were as follows for the *02, *0302, *05/6 and control probes / quenchers, respectively: 0.6 nmol/L / 5.3 nmol/L; 3.3 nmol/L / 16.6 nmol/L; 1.7 nmol/L / 13.3 nmol/L; and 3.3 nmol/L / 33.2 nmol/L. The *02 and *0302-probes and quenchers were combined in one reaction and similarly the *05/6 and control-probe-quencher-pairs were combined in another reaction. The *05/6-probe recognizes all DQB1*05 and DQB1*06 alleles.

The sample material was EDTA treated whole blood dried on a sample collection card. The DNA was detached from the sample card into solution and a small aliquot of this was used as a template in the actual PCR. In detail, EDTA treated blood was applied to FTA® Classic Card (Whatman International Ltd, Maidstone, UK) sample collection cards and 3 mm discs were cut from the dried cards into the wells of a ThermoFast® 96 PCR plate. 50 µl of H₂O was added to each well and sealed with a Microseal 'A' Sealing film and incubated at 100 °C for 10 minutes. 1 µl samples were used as templates in the homogeneous PCR assay as well as in the later PCR steps of the screening program. The thermal cycling program was performed as described previously¹⁰.

Alternatively, Whatman ProteinSaver™ 903 cards (Whatman International Ltd) could be used as sample material. With these sample cards a modification was required to the pretreatment protocol: Before boiling in water the discs were first washed with NaOH by adding 50 µl of 10 mmol/L NaOH to the discs. The plates were briefly centrifuged and the liquid was removed. Then 50 µl of water was added to each well and the plate sealed and incubated at 100 °C for 10 minutes.

The samples that based on the results of the primary screening were classified as DQB1*02/x (x≠DQB1*05/6), DQB1*0302/x or DQB1*02/DQB1*0302 were further investigated with the DELFIA® based assays (Figure 1). Of the FDR-samples also those that gave a positive result with both *0302 and *05/6 probes were included in further studies (Figure 2).

Additional assays for stage 2-3 genetic risk assessment

The secondary DQB1 typing

A modified DELFIA® assay was used to type the samples for the presence of the DQB1 alleles *0301, *0303 and *04. In short the sequence of interest was amplified according to the instructions previously described¹¹ and summarized in Table 2. The hybridization was performed using the allele specific probes for the DQB1*0301, *0303 and *04 alleles and done according to the manufacturer's instructions with small modifications as indicated in Table 3.

For the extended secondary screening for the DQB1 alleles *0501, *0502, *0503, *0601, *0602, *0603 and *0604 applied to the FDR samples positive for the *0302 and *05/6 probes in the primary screening only the number of probes in the hybridization was increased, other steps were similar to those described for the screening of DQB1 alleles *0301, *0303 and *04. The additional probes and their concentrations in the hybridization are described in Table 4.

The DQA1 screening and DRB1*04 subtyping

The DQA1 screening¹² for the DQA1 alleles *0201, *03 and *05 is in principle done as the secondary DQB1 screening. The conditions for the amplification of the area of interest are described in Table 2 and the hybridization protocol is summarized in Table 5. The conditions for the PCR for DRB1*04 subtyping are described in Table 2 and the hybridization was done as described earlier by Nejentsev et al 1999¹³.

The DRB1 assays based on allele specific amplification

The DRB1*08, DRB1*01/10 and DRB1*09/13 assays were based on allele specific PCR¹⁴ and the PCR conditions are summarized in Table 2. In these assays the PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and the interpretation of the results was based on the different sizes of the products originating from different

DRB1 alleles in the DRB1*01/10 and DRB1*09/13 assays and in the presence or lack of a PCR product in the DRB1*08 subtyping.

Results

Homogeneous screening system stage 1 genetic risk assessment

Figure 3 shows the results of 114 samples in the primary homogeneous DQB1 screening assay. The signal-to-background ratios are calculated for each probe and the cut-off values for all probes were set as shown in Figure 3 at 1.50 for the DQB1*02 and control probes (panels A and D) and at 1.30 for the DQB1*0302 and DQB1*05/6 probes (panels B and C). Samples that gave signal-to-background ratios higher than the cut-off were considered positive for the allele tested. As shown by the control probe all samples were amplified successfully. A sample showing an elevated signal-to-background ratio with the DQB1*05/6-probe, marked with an arrow in panel C, but remaining under the cut-off value was reanalyzed and shown to be negative.

Flow of the typing procedure

All samples were first analyzed using the homogeneous typing with three probes specific for HLA-DQB1*02, DQB1*0302 and DQB1*05/6 positive samples. The samples that were positive for either the DQB1*02 or DQB1*0302 but did not give a positive result with the DQB1*05/6 probe in the primary screening were further tested for the presence of DQB1*0301, DQB1*0303 and DQB1*04 in the secondary DQB1 screening using the DELFIA method. Samples positive for DQB1*0301 and DQB1*0303 were excluded and those with DQB1*0302/DQB1*04 and assumed homozygosity for DQB1*02 or DQB1*0302 were further studied.

DQA1 typing was done for the DQB1*02/DQB1*0302 and for DQB1*02 homozygous samples. If the DQB1*02/0302 positive samples gave a DQA1 genotype of *03/05 they were further studied for the DRB1*04 subtype.

The assumed DQB1*0302 homozygotes and samples with DQB1*0302/DQB1*04 genotype were also typed for the DRB1*04 subtypes. The DQB1*0302/DQB1*04 positive samples were further tested for the presence of DRB1*08 if the DRB1*04 subtyping result was neither *0403 or *0406. The selection of the individuals as eligible for the TEDDY study was done as indicated in Figure 1.

More genotypes were eligible for the first-degree relatives and thus the procedure for their typing was more complicated. In addition to the samples that in homogeneous screening gave a positive signal with the DQB1*02-probe and/or DQB1*0302-probe without DQB1*05/6 also samples positive for both DQB1*0302 and DQB1*05/6 probes were selected for more specific typing (Figure 2).

After the secondary DQB1 typing also DQB1*02/DQB1*0303 heterozygotes were tested for the DQA1 alleles as well as those with DQB1*0302/DQB1*0303. DQB1*02/DQB1*0303 heterozygotes positive for DQA1*03 and DQA1*05 and

those with the DQB1*0302/DQB1*0303 genotype with only DQA1*03 and none of the other tested DQA1 alleles were finally typed for the presence of DRB1*09 alleles with the DRB1*09/13 assay.

The DQB1*0302 positive samples that were also positive for the DQB1*05/6 in the primary DQB1 screening were further tested for the DQB1 alleles *0501, *0502, *0503, *0601, *0602, *0603 and *0604. Of these the *0302/DQB1*0502 positives were eligible for the study without additional typing. The *0302/DQB1*0501 samples were screened for the presence of the DRB1*01 and DRB1*10 alleles. All FDR samples were classified to non-eligible and eligible for the TEDDY study according to the guidelines given in Figure 2.

After all screening steps those samples that were found to be homozygous for either DQB1*02 or DQB1*0302 and eligible for the TEDDY study were sequenced for the DQB1 gene to confirm the homozygosity and that no rare DQB1 alleles were left undetected.

The numbers of samples typed with each assay in all steps are shown in brackets in the flowcharts presented in Figure 1 for the general population and in Figure 2 for the FDRs for the Finnish and German populations. The numbers of samples typed in the later stages are markedly smaller than those screened in the primary homogeneous assay for the DQB1 alleles *02, *0302 and *05/6 indicating an efficient selection by this multistage screening strategy. Only 16.5 % of the general population samples and 45.8 % of the FDR samples are typed in stage 2 DQB1 step. For the DQA1 screening, DRB1*04 subtyping and other DRB1 assays the percentages for the general population and FDRs are 5.3 and 19.3; 5.0 and 5.2; and 1.7 and 15.1, respectively. For the FDRs the percentages of samples continuing after the primary screening are to some extent higher than with the general population, as can be expected.

Discussion

The HLA class II region acts as an oligogenic superlocus that defines approximately half of the genetic component for type 1 diabetes. The genetic risk can thus to great extent be defined using HLA typing. The problem inherent in HLA typing is the enormous polymorphism and multiplicity of the loci; and to reduce the costs of genetic risk estimation in HLA associated diseases one can concentrate on the loci and alleles shown to be positively or negatively associated.

Our research group has had a long-term interest in the development of high-throughput assays for screening population cohorts for recruitment of study subjects for natural history and prevention studies in type 1 diabetes. The original assay consisted of typing those DQB1 alleles found increased or decreased among T1D patients and the procedure has thereafter been complemented by additional typing for relevant DQA1 and DRB1 alleles, which has increased its sensitivity and specificity and made it more applicable in various populations⁶.

It has to be noted, that it is possible to a great extent to reduce the number of necessary typings at some secondary loci because of the known strong linkage disequilibria between alleles at different loci. Thus the DQB1*0302 allele is always associated with DQA1*03 and DRB1*04. Typing for various DRB1*04

alleles is, however, important because the risk of the haplotype is dependent of the exact DRB1*04 allele. DRB1*0403 and DRB1*0406 in the haplotype are strongly protective and others associated with variable degree of risk. A different case is found with DQB1*02 which with DQA1*05 is coding for a risk conferring molecule whereas the other common haplotype combination, DQB1*02 with DQA1*0201, is coding for a neutral or protective molecule. Typing can thus be arranged in a stepwise manner where the result of one stage defines further typing. The current model addresses genetic risk assessment in a very robust and cost-efficient way.

The first step in the screening program for the TEDDY study includes a vast number of samples¹. A simple, inexpensive and rapid screening method is an absolute requirement for large scale projects to be performed within a practical time frame and with reasonable costs. Here we present a screening system utilizing a homogeneous approach in the primary screening step including thousands of samples.

The specificity of the introduced homogeneous assay and specifically of the previously unpublished DQB1*05/6-probe was certified by typing a set of previously analyzed samples and the results were 100 percent concordant (data not shown). With the inclusion of the DQB1*05/6-probe to the primary homogeneous screening step the percentages of samples excluded from the study in the primary step are for the general population approximately 83.5 and for the first-degree relatives 54.2. With this correct selection of analytes in the primary screening step the numbers of samples requiring further genotyping were vastly reduced.

The homogeneous assay requires only a little hands-on time and a single assay can be performed in only four hours. The stability of the system allows the measurement of the signals to be performed either right after the thermal cycling or even two days after the cycling step giving even more flexibility to the user. The reduction in the required hands-on time compared to the DELFIA based assays consisting of separate steps for PCR and hybridization also translates into significant savings in the costs for the assays. Also the reductions in the materials required for the assay contribute to the markedly lower costs of the homogeneous assay format when compared to DELFIA based assays^{11,12,15}. The simplicity of the assay is further increased by the use of blood dried on sample collection cards. The pretreatment protocol of the samples enables a multitude of assays from a single sample even when the original sample material is scarce. A single blood spot 3 mm in diameter can be used for as many as 90 different assays if a 100 µl volume of H₂O is used in the final step of the pretreatment protocol and 1 µl of this used as a sample in the PCR.

After the primary DQB1 screening the DELFIA hybridization assay concept was used for additional typing except for the few DR assays where the presence of DR1, DR8 and DR9 were ensured in DQB1*0501, DQB1*04 and DQA1*03-DQB1*0303 haplotypes. These haplotypes were parts of few eligible genotypes in family members only and the conventional gel detection was used as it was not reasonable to establish high-throughput method for such a small number of samples.

In summary, the presented risk assessment strategy employing a multistage screening procedure allows a high-resolution risk estimation that is critical when classifying subjects according to T1D genetic risk. In contrast to screening systems focusing only on DQB1 that gives limited information¹⁵, our method defines genetic risk according

to the best knowledge defined by previous population studies^{5,6,16}. The designed system allows great flexibility in the sizes of sample collections under investigation; the system is as suitable for small collections with only a few samples to be genotyped as well as large studies with thousands of samples. Importantly, modern technology enables reduction in assay time and costs, which is critical in high-throughput population screening studies^{10,17}.

References

1. Hagopian, W Å, Lernmark, A, Rewers, M J, Simell, O G, She, J X, Ziegler, A G, Krischer, J P, Akolkar, B. TEDDY--The Environmental Determinants of Diabetes in the Young: an observational clinical trial. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1079:320-326.
2. Concannon, P, Erlich, H A, Julier, C, Morahan, G, Nerup, J, Pociot, F, Todd, J A, Rich, S S. Type 1 diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families. *Diabetes* 2005;54:2995-3001.
3. Singal, D P, Blajchman, M A. Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* 1973;22:429-432.
4. She, J X. Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunol Today* 1996;17:323-329.
5. Ilonen, J, Sjöroos, M, Knip, M, Veijola, R, Simell, O, Åkerblom, H K, Paschou, P, Bozas, E, Havarani, B, Malamitsi-Puchner, A, Thymelli, J, Vazeou, A, Bartsocas, C S. Estimation of genetic risk for type 1 diabetes. *Am J Med Genet* 2002;115:30-36.
6. Hermann, R, Bartsocas, C S, Soltesz, G, Vazeou, A, Paschou, P, Bozas, E, Malamitsi-Puchner, A, Simell, O, Knip, M, Ilonen, J. Genetic screening for individuals at high risk for type 1 diabetes in the general population using HLA Class II alleles as disease markers. A comparison between three European populations with variable rates of disease incidence. *Diabetes Metab Res Rev* 2004;20:322-329.
7. Lambert, A P, Gillespie, K M, Thomson, G, Cordell, H J, Todd, J A, Gale, E A, Bingley, P J. Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4037-4043.
8. Ziegler, A G, Hummel, M, Schenker, M, Bonifacio, E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 1999;48:460-468.
9. Kiviniemi, M, Nurmi, J, Turpeinen, H, Lövgren, T, Ilonen, J. A homogeneous high-throughput genotyping method based on competitive hybridization. *Clin Biochem* 2003;36:633-640.
10. Kiviniemi, M, Nurmi, J, Lövgren, T, Ilonen, J. Locked nucleic acid (LNA) probes in high-throughput genetic analysis: Application to an assay for type 1 diabetes-related HLA-DQB1 alleles. *Clin Biochem* 2005.
11. Sjöroos, M, Iitiä, A, Ilonen, J, Reijonen, H, Lövgren, T. Triple-label hybridization assay for type-1 diabetes-related HLA alleles. *Biotechniques* 1995;18:870-877.
12. Sjöroos, M, Ilonen, J, Reijonen, H, Lövgren, T. Time-resolved fluorometry based sandwich hybridisation assay for HLA- DQA1 typing. *Dis Markers* 1998;14:9-19.
13. Nejentsev, S, Sjöroos, M, Soukka, T, Knip, M, Simell, O, Lövgren, T, Ilonen, J. Population-based genetic screening for the estimation of Type 1 diabetes mellitus

risk in Finland: selective genotyping of markers in the HLA-DQB1, HLA-DQA1 and HLA-DRB1 loci. *Diabet Med* 1999;16:985-992.

14. Bunce, M, O'Neill, C M, Barnardo, M C, Krausa, P, Browning, M J, Morris, P J, Welsh, K I. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995;46:355-367.

15. Dantonio, P, Meredith, N, Earley, M, Cordovado, S, Callan, W J, Rollin, D, Morris, D, Vogt, R F, Hannon, W H. A screening system for detecting genetic risk markers of type 1 diabetes in dried blood spots. *Diabetes Technol Ther* 2006;8:433-443.

16. Hermann, R, Turpeinen, H, Laine, A P, Veijola, R, Knip, M, Simell, O, Sipilä, I I, Åkerblom, H K, Ilonen, J. HLA DR-DQ-encoded genetic determinants of childhood-onset type 1 diabetes in Finland: An analysis of 622 nuclear families. *Tissue Antigens* 2003;62:162-169.

17. Foy, C A, Parkes, H C. Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clin Chem* 2001;47:990-1000.

Legends to figures

Figure 1. (lásd 2. Ábra fentebb) Flowchart of the genotyping steps and genetic risk assessment in the general population in the TEDDY study screening program. The assay steps are marked in boxes with dashed lines and the results of the sample genotypes continuing in the screening program are in boxes with solid line outline. Three major risk groups are defined in the primary homogeneous assay: 1) samples positive only for the DQB1*02, 2) samples positive only for the DQB1*0302 positive and 3) samples positive for both DQB1*02 and DQB1*0302. The other genotypes are not eligible for the TEDDY study. Based on the screening results the samples are further genotyped as shown in the chart with the secondary DQB1 assay, the DQA1 screening, the DRB1*04 subtyping and the additional DRB1 subtyping assays. A confirmatory sequencing is done of the homogeneous DQB1*02/02 and DQB1*0302/0302 genotypes to assure that no rare DQB1 alleles were left undetected. The numbers of samples typed with each assay are marked in brackets at each assay step for the Finnish and German samples, respectively.

Figure 2. (lásd 3. ábra fentebb) Flowchart of the genotyping steps and genetic risk assessment in the first-degree relatives in the TEDDY study screening program. The assay steps are marked in boxes with dashed lines and the results of the sample genotypes continuing in the screening program are in boxes with solid line outline. The samples not eligible for the study are left unmarked for clarity. Four major groups continuing in the screening program are defined in the primary homogeneous assay: 1) samples positive only for the DQB1*02, 2) samples positive only for the DQB1*0302 positive, 3) samples positive for both DQB1*0302 and DQB1*05/6 and 4) samples positive for both DQB1*02 and DQB1*0302. The other genotypes are not eligible for the TEDDY study. The numbers of samples typed with each assay are marked in brackets at each assay step for the Finnish and German samples, respectively.

Figure 3. (lásd 6. ábra lentebb) Results of the preliminary homogeneous screening assay for the DQB1 alleles *02, *0302 and *05/6. The signal-to-background ratios of the *02-probe, the *0302-probe, the *05/6-probe and the control probe are shown in panels A, B, C and D, respectively. The cut-off value for each probe is marked with a black horizontal line. The sample marked with an arrow in panel C was retyped and found to be negative for the DQB1 alleles *05 and *06.

Table 1. The oligonucleotides used in this study.

Assay	Oligonucleotide	Sequence from 5' to 3' end	Label/position
Primary DQB1 screening (homogeneous)	DQB1-HG 5' primer	GGGCATGTGCTACTTCACCAACG	
	DQB1-HG 3' primer	CCTTCTGGCTGTTCCAGTACT	
	*02-probe	<u>A</u> AGATCGTG	Tb/5'
	*02-quencher	CGCACGATCTCT	dabcyl/3'
	*0302-probe	<u>C</u> CGCCTG <u>C</u> C	Eu/5'
	*0302-quencher	GGCAGGCGG	dabcyl/3'
	*05/6-probe	<u>G</u> GG <u>C</u> G <u>G</u> C <u>T</u>	Tb/5'
	*05/6-quencher	AGGCCGCC	dabcyl/3'
	control-probe	CG <u>T</u> TCGACAG	Eu/5'
	control-quencher	CTGTCTGAAGCG	dabcyl/3'
Secondary DQB1 screening	DQB1 5' primer	GCATGTGCTACTTCACCAACG	
	DQB1 3' primer	CCTTCTGGCTGTTCCAGTACT	biotin/5'
	*0301-probe	ACGTGGAGGTGTAC	Sm
	*0301/3-probe	CCGCCTGACGC	Tb
	*04-probe	AACGGGACCGAGC	Eu
	*04/5-probe	TGCGGGGTGTGAC	Sm
	*0501-probe	ACCGGGCAGTGAC	Sm
	*0502-probe	CCGCCTGACGC	Tb
	*0601-probe	AGGAGGACGTGC	Eu
	*0602/3-probe	GTACCGCGCGGT	Eu
	*0603/4-probe	TTGTAACCAGACACA	Sm
	control-probe	CTTCGACAGCGACG	Tb
DQA1 screening	DQA1 5' primer	GGTAGCAGCGGTAGAGTTG	
	DQA1 3' primer	TATGGTCTAAACTTGACCAGT	
	*0201-probe	CACAGCAACTTCCAGAC	Tb
	*03-probe	TCATGGCTGTACTG	Eu
	*05-probe	TAATCAGACTGTTCA	Sm
DRB1*04 screening	see reference Nejetsev et. al 1999		
DRB1*08 typing	DRB1*08 5' primer	AGTACTCTACGGGTGAGTGTT	
	DRB1*08 3' primer	CTGCAGTAGGTGTCCACCAG	
	control 5' primer (DQB1 5' primer)	GCATGTGCTACTTCACCAACG	
	control 3' primer (DQB1 3' primer)	CCTTCTGGCTGTTCCAGTACT	
DRB1*01/*10 typing	DRB1*01 5' primer	TTGTGGCAGCTTAAGTTTGAAT	
	DRB1*10 5' primer	CGGTTGCTGGAAAGACGCG	
	DRB1*01/*10 3' primer	CTGCACTGTGAAGCTCTCAC	
DRB1*09/*13 typing	DRB1*09 5' primer	GTTTCTTGAAGCAGGATAAGTTT	
	DRB1*09 3' primer	CCCGTAGTTGTGTCTGCACAC	
	DRB1*13 5' primer	GTTCTTGGACAGATACTTCC	
	DRB1*13 3' primer	TCCACCGCGGCCCGCTC	

underlined bases are LNA

Table 2. The PCR conditions used in this study.

	secondary DQB1 screening	DQA1 screening	DRB1*04 screening	DRB1*08 typing	DRB1*01/*10 typing	DRB1*09/*13 typing
reaction volume	80 µl (110 µl [#])	80 µl	60 µl	20 µl	20 µl	20 µl
buffer	1x HyTest PCR buffer	1x HyTest PCR buffer	1x HyTest PCR buffer	1x HyTest PCR buffer	1x HyTest PCR buffer	1x HyTest PCR buffer
MgCl ₂	3.0 mmol/L	5.0 mmol/L	3.0 mmol/L	4.0 mmol/L	4.0 mmol/L	4.0 mmol/L
dNTPs	0.2 mmol/L	0.2 mmol/L	0.2 mmol/L	0.2 mmol/L	0.2 mmol/L	0.2 mmol/L
betaine	1.5 mol/L	1.5 mol/L	1.5 mol/L	1.5 mol/L	1.5 mol/L	1.5 mol/L
BSA	-	0.1 g/L	-	-	-	-
polymerase	HyTest 7T1 0.015 U/µl	HyTest 7T1 0.019 U/µl	HyTest 7T1 0.033 U/µl	HyTest 7T1 0.025 U/µl	HyTest 7T1 0.025 U/µl	HyTest 7T1 0.025 U/µl
primers	0.2 µmol/L	0.2 µmol/L	0.5 µmol/L	DRB1*08 primers 0.3 µmol/L control primers 0.2 µmol/L	0.3 µmol/L	0.3 µmol/L
thermal cycling	1) 95 °C for 6 min 2) 59.5 °C for 4 min 3) 0.5 °C/s to 73 °C 4) 73 °C for 2 min 5) 95 °C for 1 min 6) 59.5 °C for 1 min 30 s 7) 0.5 °C/s to 73 °C 8) 73 °C for 2 min repeat steps 5-8 34 times 9) 73 °C for 5 min	1) 96 °C for 3 min 2) 55 °C for 2 min 3) 73 °C for 2 min 4) 96 °C for 45s 5) 55 °C for 45 s 6) 73 °C for 1 min 7) 73 °C for 2 min	1) 96 °C for 4 min 2) 96 °C for 20 s 3) 51 °C for 30 s 4) 72 °C for 30 s repeat steps 2-4 40 times 5) 72 °C for 2 min	1) 96 °C 1 min 2) 96 °C 25 s 3) 63 °C 45 s 4) 72 °C 45 s repeat steps 2-4 4 times 5) 96 °C 25 s 6) 58 °C 50 s 7) 72 °C 45 s repeat steps 5-7 30 times 8) 96 °C 25 s 9) 48 °C 1 min 10) 72 °C 2 min repeat steps 8-10 4 times	1) 96 °C 1 min 2) 96 °C 25 s 3) 63 °C 45 s 4) 72 °C 45 s repeat steps 2-4 4 times 5) 96 °C 25 s 6) 58 °C 50 s 7) 72 °C 45 s repeat steps 5-7 30 times 8) 96 °C 25 s 9) 48 °C 1 min 10) 72 °C 2 min repeat steps 8-10 4 times	1) 96 °C 1 min 2) 96 °C 25 s 3) 60 °C 45 s 4) 72 °C 45 s repeat steps 2-4 4 times 5) 96 °C 25 s 6) 58 °C 50 s 7) 72 °C 45 s repeat steps 5-7 30 times 8) 96 °C 25 s 9) 45 °C 1 min 10) 72 °C 2 min repeat steps 8-10 3 times

[#] 110 µl used in typing the
DQB1*0302 and *05/6 positive
1st degree relatives

Table 3. Secondary DQB1 screening – hybridization for the DQB1 alleles *0301, *0303 and *04.

Step #	
1.	Add 8 µl of PCR-product and 50 µl of Assay Buffer per well into a streptavidin coated 96-well plate
2.	Shake slowly for 30 min at room temperature, plate covered with sealer
3.	Wash the plates four times with a room temperature wash solution
4.	Add 150 µl of 50 mM NaOH per well
5.	Shake slowly for 5 min at room temperature
6.	Wash the plates four times with a room temperature wash solution
7.	Add the probes in 100 µl volume per well of Assay Buffer containing in final concentrations 1 M NaOH and 0,1 % Tween *0301-probe with samarium label 1.0 ng/well *0301/3-probe with terbium label 1.5 ng/well *04-probe with europium label 0.5 ng/well
8.	Incubate at +37 °C for 2 hours, no shaking, plate covered with sealer
9.	Wash six times with washing solution heated to +46 °C
10.	Add 100 µl of DELFIA Enhancement Solution per well
11.	Shake slowly for 25 min at room temperature
12.	Measure the europium and samarium fluorescence
13.	Add 25 µl DELFIA Enhancer per well
14.	Shake slowly for 5 min at room temperature
15.	Measure the terbium fluorescence

Table 4. Secondary DQB1 screening for the first-degree relatives – additional hybridization probes for DQB1 alleles *04/5, *0501, *0502, *0601, *0602/3 and *0603/4.

probe	ng / well	alleles recognized by the probe
*04/05-samarium	2.0	*04, *05
*0501-samarium	8.2	*0501
*0502-terbium	2.0	*0502, *0504
*0601-europium	1.0	*0601
*0602/3-europium	1.0	*0602, *0603
*0603/4-samarium	2.0	*0603, *0604

Table 5. The hybridization steps in the DQA1 screening. Only the deviations from the protocol used for the DQB1 secondary screening assay (Table 3) are shown.

Step	
1.	Add 10 µl of PCR-product and 50 µl of Assay Buffer per well into a streptavidin coated 96-well plate
2.-6.	Same as in secondary DQB1 screening hybridization (see table 3)
7.	Add the probes in 100 µl volume per well of Assay Buffer containing in final concentrations 1 M NaOH and 0,1 % Tween *0201-probe with terbium label 1.0 ng/well *03-probe with europium label 0.5 ng/well *05-probe with samarium label 5.0 ng/well
8.-15.	Same as in secondary DQB1 screening hybridization (see table 3)

6. ábra (Figure 3 a kéziratban)

